

**CLONAGE ET EXPRESSION D'UN GÈNE CODANT POUR UNE
 β -1,6-GLUCANASE PROVENANT DE L'ACTINOMYCÈTE *Streptomyces* sp. EF-14**

par

HAPSATOU MAMADY

mémoire présenté au Département de biologie en vue
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, Juin 1999



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-56912-8

Le 26 juin 1999 , le jury suivant a accepté ce mémoire dans sa version finale.
date

Président-rapporteur: Mme Carole Beaulieu
Département de biologie

Membre: M. Adrien R. Beaudoin
Département de biologie

Membre: M. Ryszard Brzezinski
Département de biologie

SOMMAIRE

Les β -glucanes sont des polymères de D-glucose constituant la majeure partie des parois cellulaires de levures et de champignons. Plusieurs enzymes pouvant hydrolyser les β -glucanes ont déjà été purifiées et caractérisées. Parmi ces enzymes incluant les β -1,3- et les β -1,4-glucanases, les β -1,6-glucanases sont les moins étudiées. Ces dernières pourraient être un outil potentiel de lutte biologique contre les champignons phytopathogènes, être utilisées dans la production de protéines en lysant et désintégrant les cellules microbiennes, dans la production des protoplastes de levures et de champignons pour des études moléculaires etc.

Des recherches récentes de notre laboratoire ont permis de purifier et de caractériser une β -1,6-glucanase provenant de l'actinomycète *Streptomyces* sp. EF-14. La séquence N-terminale de cette enzyme a été déterminée: ADPTAQVWVTTPDGA. Afin de cloner le gène codant pour cette β -1,6-glucanase bactérienne, un oligonucléotide KF-1 a été synthétisé en se basant sur la séquence N-terminale de cette protéine.

Ce projet de recherche a débuté avec la construction d'une banque de gènes de *Streptomyces* sp. EF-14 dans *Escherichia coli* afin de cloner le gène de la β -1,6-glucanase. Le vecteur navette pFD666 a été utilisé pour faciliter le transfert de cette banque dans une souche hétérologue, *Streptomyces lividans* TK-24. Pour le criblage de la banque de gènes, deux méthodes ont été utilisées: la première est la détection phénotypique sur boîte de pétri qui laisse apparaître une zone claire, visible à l'oeil nu, due à la dégradation du substrat par l'enzyme et la seconde est l'hybridation avec l'oligonucléotide KF-1 pour une sélection par élimination des populations plasmidiques. La détection phénotypique sur un milieu contenant le pustulane comme source de carbone nous a permis de sélectionner un clone β -1,6-glucanase positif: pMH31.

Par hybridation, la région d'homologie avec l'oligonucléotide KF-1 a été localisée sur un fragment d'ADN de 1,58 Kb du clone pMH31. La séquence en nucléotides de ce fragment a été par la suite déterminée. L'analyse de cette séquence ainsi que d'autres tests de dégradation de divers substrats de β -glucanes par le clone pMH31 nous a amené à conclure que l'insert d'ADN cloné ne porte pas le gène de la β -1,6-glucanase purifiée chez *Streptomyces* sp. EF-14 mais plutôt un autre gène codant pour une protéine pouvant reconnaître autant les liens β -1,6- que les liens β -1,3- glycosidiques.

REMERCIEMENTS

J'adresse mes remerciements plus particulièrement à mon directeur de recherche le Dr. Ryszard Brzezinski pour sa disponibilité, ses critiques et ses conseils judicieux qui ont grandement contribué à ma formation en recherche.

Je tiens à remercier mes conseillers les docteurs Carole Beaulieu et Adrien Beaudoin pour leur collaboration et pour l'aide qu'ils m'ont apportée lors de mes études graduées. J'aimerais remercier le Dr. Claude Déry pour ses conseils et pour les périodes de discussions qu'il m'a accordées ainsi que M. Daniel Paradis pour avoir scanné les photos de gel et les autoradiogrammes.

Je remercie mes collègues de travail Caroline Leclerc pour l'aide apportée lors de certaines expériences et Antonin Gauthier pour les analyses informatiques des séquences d'ADN. Je voudrais également remercier toute l'équipe du Groupe de Recherche en Biologie des Actinomycètes pour les discussions, les échanges et l'atmosphère agréable que les collègues ont su créer au laboratoire. Je témoigne ma reconnaissance à ceux et celles qui ont collaboré, de près ou de loin, à la réalisation de ce projet de recherche.

Finalement, j'adresse mes remerciements tout spécialement à mon époux et mon fils pour leur soutien et leur patience, à tous les membres de ma famille et à mes amies Agnès Dupuy, Marie-Claude Leclerc et Nathalie Côté pour leur encouragement tout au long de mes études graduées.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	ii
REMERCIEMENTS	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES ABRÉVIATIONS	viii
LISTE DES TABLEAUX	x
LISTE DE FIGURES	xi
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 - MATERIEL ET METHODES	11
1.1 Souches bactériennes et plasmides	11
1.2 Milieux de culture	11
1.2.1 Milieux de propagation des souches bactériennes	11
1.2.2 Antibiotiques utilisés pour la sélection des transformants	13
1.2.3 Traitement de <i>E. coli</i> DH10B à la coumermycine A ₁	13
1.2.4 Détection de l'activité β -1,6-glucanase sur boîte de pétri	14
1.2.5 Milieux de production de la β -1,6-glucanase	14
1.3 Préparation des cellules compétentes et des protoplastes	15
1.4 Manipulation de l'ADN et construction de la banque génomique	16
1.4.1 Isolement de l'ADN génomique	16
1.4.2 Transfert de type Southern et hybridation	16
1.4.3 Isolement des ADN _s plasmidiques	17
1.4.4 Construction de la banque génomique de <i>Streptomyces</i> sp. EF-14 ..	18
1.5 Criblage de la banque génomique	19

1.5.1 Détection phénotypique	19
1.5.2 Criblage par hybridation	20
1.6 Identification et séquençage des fragments d'ADN des clones homologues à l'oligonucléotide KF-1	21
1.6.1 Identification de la région d'homologie des clones avec KF-1	21
1.6.2 Production d'ADN sb	21
1.6.3 Séquençage d'ADN	22
1.7 Analyse informatique des séquences d'ADN	22
1.8 Transfert de la banque génomique de <i>Streptomyces</i> sp. EF-14 dans <i>S. lividans</i> TK-24	23
1.8.1 Transformation des protoplastes avec la banque amplifiée	23
1.8.2 Transfert de pMH31 dans <i>S. lividans</i> TK-24	23
1.9 Production de la β -1,6-glucanase par les clones	23
1.10 Détermination des sucres réducteurs selon la méthode de Nelson-Somogyi ..	25
1.11 Détermination des sucres réducteurs à l'aide du réactif PAHBAH	25
1.12 Produits d'hydrolyse de différents substrats par la β -1,6-glucanase purifiée chez <i>Streptomyces</i> sp. EF-14	26
1.12.1 Digestion des différents substrats	26
1.12.2 Chromatographie sur couche mince des produits de digestion	27
CHAPITRE 2 - RESULTATS	28
2.1 Digestion du génome de <i>Streptomyces</i> sp. EF-14 et hybridation avec KF-1 et KF-2	28
2.2 Construction des banques génomiques <i>Bam</i> HI et <i>Bgl</i> III de EF-14	28
2.3 Criblage des clones positifs	30
2.3.1 Détection phénotypique	30
2.3.2 Traitement à la coumermycine A ₁	32

2.3.3 Criblage par hybridation avec KF-1	34
2.4 Carte de restriction de pMH31	37
2.5 Séquençage des fragments d'ADN homologues à la sonde KF-1	42
2.6 Transfert de la banque génomique de EF-14 dans <i>S. lividans</i> TK-24	58
2.7 Mécanisme d'action de la β -1,6-glucanase purifiée chez <i>Streptomyces</i> sp. EF-14....	
.....	60
DISCUSSION	63
CONCLUSION	74
ANNEXES	76
ANNEXE 1: Calcul de l'efficacité de transformation de la banque de gènes	76
ANNEXE 2: Séquences nucléotidiques des sous-clones de pMH31	77
BIBLIOGRAPHIE	80

LISTE DES ABRÉVIATIONS

a.a.: acide aminé
ADN: acide désoxyribonucléique
ADN sb: acide désoxyribonucléique simple brin
amp: ampicilline
°C: degré celsius
CCM: chromatographie sur couche mince
D.O.: densité optique
EDTA: acide éthylènediaminetétraacétique
G+C: contenu en guanine plus cytosine
IPTG: isopropylthio- β -galactoside
kan: kanamycine
Kb: kilobase
KDa: kilodalton
KV: kilovolt
LB: Luria Bertani
Mol% G+C: pourcentage molaire des bases guanine et cytosine
mU: milliunité
neo: gène de résistance à la néomycine/kanamycine
ORF: cadre de lecture ouvert
PAHBAH: hydrazide de l'acide p-hydroxybenzoïque
pb: paire de bases
PM: poids moléculaire
PMSF: phenylmethylsulfonyl fluorure
p/v: rapport poids/volume
SCM: site de clonage multiple

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

SLM3: milieu de sporulation pour les actinomycètes

SSC: standard saline citrate

TAE: Tris-acétate-EDTA

TB: terrific broth

TBE: Tris-borate-EDTA

Tet: tetracycline

t_m : temperature de fusion

TSA: tryptic soy agar

TSB: tryptic soy broth

μg : microgramme

μM : micromolaire

LISTE DES TABLEAUX

- I. Comparaison des aspects physico-chimiques et moléculaires des β -1,6-glucanases provenant de *Streptomyces* sp. EF-14 et de *Trichoderma harzianum* 9
- II caractéristiques des souches bactériennes et des plasmides utilisés pour le clonage du gène de la β -1,6-glucanase 12
- III. Expression des β -glucanases par le clone DH10B(pMH31) sur des milieux solides contenant différentes sources de carbone et 1,5% d'agarose ou d'agar 33

LISTE DE FIGURES

1.	Hybridation de l'ADN génomique de EF-14 digéré par différentes enzymes de restriction avec l'oligonucléotide KF-1 marqué au ³² P.	29
2.	Expression de la β -1,6-glucanase par <i>E. coli</i> DH10B transformée avec le plasmide pMH31.	31
3.	Stratégie de criblage de la banque totale <i>Bgl</i> III de <i>Streptomyces</i> sp. EF-14 par hybridation avec la sonde KF-1	35
4.	Hybridation des populations plasmidiques de A à T, provenant de la banque génomique de EF-14, avec la sonde KF	36
5.	Hybridation des populations plasmidiques F, H, Q et S, divisées chacune en 7 sous-populations, avec la sonde KF-1.	38
6.	Analyse des clones H5(26), Q3(16) et S4(13) dont l'ADN provient respectivement des colonies uniques des sous-populations H5, Q3 et S4.	39
7.	Carte de restriction du clone pMH31.	40
8.	Identification du fragment d'ADN du clone pMH31, homologue à la sonde KF-1.	41
9.	Séquence nucléotidique du fragment de 0,780 kb du clone H5(26).	43
10.	Analyse informatique de la séquence nucléotidique du fragment <i>Xho</i> I- <i>Xho</i> I de 0,780 Kb	

	du clone H5(26) à l'aide du programme FRAME	44
11.	Séquence nucléotidique hypothétique (658 bases) et en acides aminés (cadran de lecture-3) du fragment de 0,780 Kb du clone H5(26)	46
12.	Analyse comparative de la séquence en acides aminés de l'ORF 208 (séquence du haut), du 1 ^{er} a.a. au 208 ^e a.a., avec celle de la glutamate synthase ferredoxine-dépendante de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (séquence du bas) entre les nucléotides 29229 et 29864.	47
13.	Séquence nucléotidique du fragment de 0,880 Kb du clone S4(13) et séquence en acides aminés déduite (cadran de lecture +1).	48
14.	Analyse comparative de la séquence en acides aminés de l'ORF 176 (séquence du haut) du 97 ^e a.a. au 158 ^e a.a. et celle de l'histidine kinase de <i>R. etli</i> (séquence du bas).	49
15.	Séquence nucléotidique du fragment <i>Not</i> I- <i>Sac</i> II de 1687 pb (1,7 Kb) provenant du clone pMH31.	51
16.	Séquence nucléotidique et en acides aminés du fragment <i>Not</i> I- <i>Sac</i> II de 1688 pb (1,7 Kb) provenant du clone pMH31.	53
17.	Analyse comparative de la séquence en acides aminés de l'ORF 286 (séquence du haut) avec celle de la protéine hypothétique SC5C7.22c de <i>S. coelicolor</i> (séquence du bas).	56
18.	Analyse comparative de la séquence en acides aminés de l'ORF 198 (séquence du haut)	

- avec celle de la benzaldéhyde déshydrogénase de *B. subtilis* (séquence du bas). . . 57
19. Séquence en nucléotides du fragment *SmaI-SmaI* de 1,6 Kb provenant du clone pMH31 et sous-cloné dans le plasmide pBluescript SKII⁺ (sous-clone pMH318C). 59
20. Analyse des produits d'hydrolyse du pustulane libérés par l'action de la β -1,6-glucanase purifiée pendant différents temps de digestion: 5 min, 20 min, 60 min et 24 heures.. 62
21. Séquence nucléotidique du sous-clone pMH315 portant un insert d'ADN *Not I-SalI* de 2,15 Kb provenant du fragment de 2,9 Kb de pMH31 et cloné dans pBluescript SKII⁻. .77
22. Séquence nucléotidique du sous-clone pMH318D portant un insert d'ADN *SmaI-SmaI* de 1,6 Kb provenant de pMH31 et cloné dans pBluescript SKII⁻ 78
23. Séquence nucléotidique du sous-clone pMH319 portant un insert d'ADN *SmaI-SalI* de 0,8 Kb provenant de pMH31 et cloné dans pBluescript SKII⁺ 79

INTRODUCTION

Les β -glucanes sont des polymères de glucose, formés de liens glycosidiques de type β entre les différents monomères. Ils constituent après les celluloses, la classe la plus abondante de polysaccharides, retrouvée chez plusieurs microorganismes et plantes supérieures. Les β -glucanes sont présentes chez ces organismes sous forme de matériels de réserve vacuolaires et cytoplasmiques, comme des substances extracellulaires et surtout comme des entités structurales des parois cellulaires (Bielecki et Galas, 1991).

Selon la structure chimique, il existe différents types de β -glucanes, constitués de liens glycosidiques de type β -1,3-; β -1,4- et β -1,6-. Certains sont relativement simples, avec des liens glycosidiques identiques entre tous les résidus de sucre, comme ceux retrouvés dans la laminarine (β -1,3-) et le pustulane (β -1,6-). D'autres par contre sont plus complexes avec plus d'un type de liens glycosidiques dans la chaîne linéaire, comme ceux retrouvés dans le lichenane formé de liens de type β -1,3- et β -1,4- (Yalpani, 1988). Des β -glucanes de grande complexité sont également retrouvés dans les parois cellulaires de levures telles que *Candida albicans*. Ces β -glucanes sont hautement branchés, avec une prédominance des liens glycosidiques de type β -1,3- ou β -1,6- (Bishop *et al*, 1960; Gopal *et al*, 1984). Des études effectuées chez une variété de levures indiquent que les glucanes peuvent être classifiés selon leur solubilité: les uns solubles en milieu alcalin et les autres, solubles dans l'acide acétique et insolubles en milieu alcalin. Les β -1,3-glucanes insolubles en milieu alcalin ont une structure branchée formée de liens glycosidiques de type β -1,3- et β -1,6- et ne contiennent que 19% de liens de type β -1,3- (Manners *et al*, 1973; Bacon *et al*, 1967). Par contre, les β -1,3-glucanes solubles en milieu alcalin ne sont constitués que d'une faible quantité de liens β -1,6-glycosidiques. Dans ce dernier type de glucanes, les chaînes latérales contiennent des résidus de mannose reliant la couche externe de la paroi cellulaire formée de mannanes aux β -1,3-glucanes insolubles en milieu alcalin (Fleet et Manners, 1977).

Dans la nature, les β -1,6-glucanes sont moins répandus que les β -1,3- et β -1,4-glucanes.

Selon Varner et Lin (1989), les β -1,6-glucanes ainsi que les enzymes les hydrolysant n'ont jamais été décrits chez les plantes, sauf chez l'espèce de lichens *Umbilicaria pustulata* (Lindberg et McPherson, 1954). Parmi les β -1,6-glucanes linéaires décrits dans la littérature, les mieux connus sont le pustulane provenant des espèces de lichens *Umbilicaria* et le lutéane provenant de *Penicillium luteum* (Pitson *et al*, 1996). Cependant, les liens β -1,6- sont fréquents dans les glucanes des parois cellulaires de levures et de champignons filamenteux qui sont eux-mêmes producteurs d'enzymes hydrolysant ce type de liens (Bielecki et Galas, 1991).

Les β -glucanases sont des enzymes qui hydrolysent les β -glucanes. Elles sont classées selon le type de liens glycosidiques clivés dans le β -glucane et selon le mécanisme d'action sur le substrat. Ainsi, les β -1,3-; β -1,4- et β -1,6-glucanases coupent respectivement les liens glycosidiques de type β -1,3-; β -1,4- et β -1,6- dans les chaînes du polymère. En examinant les produits d'hydrolyse du β -glucane par les β -glucanases, deux modes d'action ont été rapportés: les mécanismes endo-glucanolytique et exo-glucanolytique (Noronha et Ulhoa, 1996). En effet, les endo- β -glucanases hydrolysent le substrat en clivant les liens glycosidiques au hasard le long de la chaîne du polysaccharide, libérant ainsi des oligosaccharides de taille variée, alors que les exo- β -glucanases hydrolysent le substrat en clivant les résidus de glucose aux extrémités non réductrices du substrat, libérant des monomères et des dimères de glucose.

Dans la littérature, les chitinases et les β -1,3-glucanases sont proposées comme étant les principales enzymes de dégradation des parois cellulaires des champignons puisque ceux-ci ont des parois majoritairement formées de chitine et de β -1,3-glucanes (Papavizas, 1985), sauf chez les champignons de la classe des Oomycètes dont les parois contiennent des β -1,3-glucanes et de la cellulose (Bartnicki-Garcia, 1968). Par ailleurs, d'autres enzymes telles que les β -1,6-glucanases pourraient être impliquées dans une dégradation des parois mycéliales et conidiales des champignons phytopathogènes, de façon efficace et complète (Lora *et al*, 1995).

Bien que plusieurs champignons produisent des β -1,6-glucanases, seulement quelques-unes de celles-ci ont été purifiées et caractérisées selon leur mode d'action sur divers substrats (Reese *et al*, 1962). En examinant l'action hydrolytique des β -1,6-glucanases sur les parois cellulaires de levure, ainsi que leur spécificité de substrat, Rombouts *et al* (1978) ont décrit deux groupes de β -1,6-glucanases chez *Bacillus circulans* WL-12. La première est une β -1,6-glucanase à caractère lytique, c'est-à-dire qu'en plus d'hydrolyser les liens β -1,6- dans la paroi de levure (spécificité principale), cette enzyme coupe également les liens β -1,3- adjacents aux résidus glycosidiques en C₆, point de branchement sur la chaîne principale (β -1,3-) du glucane. En plus de son action positive sur les parois cellulaires et les glucanes de levures, cette β -1,6-glucanase aurait une forte activité sur du pustulane soluble (β -1,6-glucane linéaire) générant du gentiobiose et du gentiotriose comme produits finaux d'hydrolyse, accompagnés d'une petite quantité de D-glucose. Ainsi, les β -1,6-glucanases à caractère lytique regroupent la β -1,6-glucanase lytique de *Bacillus circulans* WL-12 (Rombouts *et al*, 1978) et celles qui sont purifiées chez *Acremonium persicinum* (Pitson *et al*, 1996), *Mucor hiemalis* (Miyazaki et Oikawa, 1976), *Rhizopus chinensis* (Yamamoto *et al*, 1974), *Gibberella fujikuroi* (Shibata et Fukimbara, 1973) et *Penicillium brefeldianum* (Schep *et al*, 1984). Toutes ces β -glucanases agissent selon le mécanisme endoglucanolytique et génèrent comme produits finaux à partir du pustulane, du gentiobiose et du gentiotriose à l'exception de celle de *Bacillus circulans* qui produit en plus, une faible quantité de D-glucose. Par ailleurs, la β -1,6-glucanase purifiée par Lora *et al* (1995) chez le champignon *Trichoderma harzianum*, bien qu'ayant un caractère lytique, ne produit que du gentiobiose comme produit final lors de l'hydrolyse du pustulane.

Contrairement aux β -1,6-glucanases à caractère lytique, celles du deuxième groupe décrites par Rombouts *et al* (1978), ont un caractère non lytique du fait de leur action hydrolytique partielle sur les parois de levure. En fait, ces enzymes à caractère non lytique coupent uniquement les liens β -1,6- lorsque leur activité est testée en utilisant la paroi de levures comme substrat. Leur action hydrolytique sur le pustulane est plus élevée, comparée à celle des

β -1,6- glucanases à caractère lytique. Les produits finaux d'hydrolyse sont en majorité du glucose et du gentiobiose. Ces enzymes ont un mode d'action endo-glucanolytique et sont capables d'hydrolyser du gentiotriose en gentiobiose et en glucose. Ainsi, les β -1,6-glucanases à caractère non lytique regroupent celle de *Bacillus circulans* (β -1,6-glucanase non lytique) qui produit exceptionnellement une faible quantité de gentiotriose (Rombouts *et al*, 1978) et celles de *Neurospora crassa* (Hiura *et al*, 1987), *Acinetobacter* sp. (Katohda *et al*, 1979) et *Penicillium italicum* (Santos *et al*, 1977). Malgré la production de glucose à partir des β -glucanes, il a été démontré que toutes ces β -1,6-glucanases n'ont aucune activité β -glucosidase (Schep *et al*, 1984). La comparaison des propriétés physico-chimiques de toutes les β -1,6-glucanases purifiées et caractérisées plus en détails montre que chez les champignons ces enzymes ont un poids moléculaire (PM) variant entre 31 et 50 KDa alors que chez les bactéries, leur PM se situe dans un intervalle de 50 à 66 Kda. De plus, il a été rapporté que la majorité de ces β -1,6-glucanases possède une activité optimale à des pHs allant de 4,5 à 5,5 et une température optimale se situant entre 50 et 60°C (Fayad, 1997).

Différents mécanismes de régulation contrôlent la production des β -1,6-glucanases chez les champignons et les bactéries. Des études effectuées par Reese *et al* (1969), sur la distribution des β -1,6-glucanases chez les champignons, montrent en général que ces enzymes sont présentes de façon constitutive. Cependant, chez les bactéries, les β -1,6-glucanases sont inductibles par les parois cellulaires et les glucanes de levures et par les β -glucanes comme le pustulane (Fleet et Phaff, 1974; Rombouts et Phaff, 1976; Katohda *et al*, 1979). Par ailleurs, chez *Penicillium italicum*, la β -1,6-glucanase bien qu'étant constitutive, est aussi sujette à la répression catabolique par le glucose et d'autres sources de carbone permettant une croissance active du mycélium (Santos *et al*, 1977). La répression catabolique a également été observée chez *Trichoderma harzianum* (Lora *et al*, 1995). A l'opposé, chez d'autres champignons, tel *Trichoderma viride*, la présence du glucose stimule plutôt l'activité β -1,6-glucanase (Del Rey *et al*, 1979). Le phénomène d'induction est connu chez plusieurs champignons et bactéries

notamment *Trichoderma harzianum* (Lora *et al*, 1995), *Mucor hiemalis* (Miyazaki et Oikawa, 1976), *Gibberella fujikuroi* (Shibata et Fukimbara, 1972), *Penicillium brefeldanum* (Schep *et al*, 1984) et *Bacillus circulans* WL-12 (Fleet et Phaff, 1974).

En 1996, des activités β -1,6-glucanolytiques ont été décrites pour la première fois chez les actinomycètes (Valois *et al*, 1996). En effet, les actinomycètes sont des bactéries gram positives, qui sont retrouvées au niveau du sol et qui se développent sous une forme mycéliale. Dans la rhizosphère, ces bactéries obtiennent leurs nutriments à partir des débris organiques en utilisant une gamme variée d'enzymes hydrolytiques excrétées dans le milieu environnant (Williams *et al*, 1983). Parmi les enzymes impliquées dans le processus de biodégradation de la matière organique (incluant les protéases, les nucléases, les lipases et plusieurs enzymes hydrolysant des polysaccharides plus complexes), on trouve aussi les β -glucanases. En effet, Valois *et al* (1996) ont isolé treize souches d'actinomycètes qui, en plus de produire des métabolites inhibant la croissance du champignon *Phytophthora*, synthétisaient toutes des β -1,3-, β -1,4- et β -1,6-glucanases hydrolysant les parois cellulaires de ce champignon.

Le *Phytophthora* est un champignon pathogène qui cause des maladies chez plusieurs plantes. Ce genre de champignon appartient à la classe des Oomycètes et se distingue des autres champignons par différents aspects biochimiques. En effet, les parois cellulaires du *Phytophthora* ne contiennent pas de chitine et sont constituées principalement de β -glucanes, qui représentent 80 à 90% du poids sec des parois (Bartnicki-Garcia et Wang, 1987). Deux types de β -glucanes, jouant un rôle important au cours de la morphogénèse, sont retrouvés chez ce champignon: les β -glucanes cellulosiques et non-cellulosiques. Ces deux types de β -glucanes varient en proportion d'un stade à l'autre du cycle vital du champignon (sporange, zoospore, kyste, chlamydospore, oospore etc). La fraction cellulósique de ces β -glucanes est constituée de liens glycosidiques β -1,4-, typiques de ceux de la cellulose. La fraction non-cellulosique qui est la plus abondante, contient des liens glycosidiques β -1,3- hautement branchés avec des liens de

type β -1,6- au point de branchement des résidus. Dans cette fraction non-cellulosique, 10% des polymères de glucose sont formés de liens de type β -1,4- (Bartnicki-Garcia et Wang, 1983). Selon Zevenhuizen et Bartnicki-Garcia (1969), la fréquence des embranchements par des liens β -1,6- est aussi élevée chez *Phytophthora* que chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et par conséquent, ces deux organismes auraient une forte similarité dans leur structure chimique de β -glucanes. Ainsi donc, une hydrolyse complète des parois cellulaires de *Phytophthora* nécessiterait une gamme variée d'enzymes parmi lesquelles on trouverait des β -1,3-, des β -1,4- et des β -1,6-glucanases. L'action de la β -1,6-glucanase serait dans ce cas indispensable puisqu'elle agirait comme une enzyme de débranchement des chaînes latérales de β -glucanes pour faciliter l'attaque par les autres enzymes, les β -1,3- et β -1,4-glucanases. Vue le rôle premier que joue la β -1,6-glucanase dans le processus de lyse du mycélium de *Phytophthora*, l'intérêt fondamental pour l'étude de cette enzyme s'est accrue. C'est donc cette enzyme qui est le sujet de ce travail.

Onze des treize souches d'actinomycètes isolées par Valois *et al* (1996), ont été caractérisées. Elles appartenaient toutes au genre *Streptomyces* et protégeaient les plantes de framboisiers contre les infections causées par *Phytophthora*. Selon Toussaint *et al* (1997), ces souches inhibaient également la croissance d'autres espèces de champignon telles que *Pythium ultimum*. Par ailleurs, l'antagonisme entre les actinomycètes et les champignons est connu pour une variété d'agents phytopathogènes tels que *Alternaria* (Chattopadhyay et Nandi, 1982), *Rhizoctonia* (Rothrock et Gottlieb, 1984) et *Fusarium* (Sabaou et Bounaga, 1987). Récemment, un biofongicide à base de cellules vivantes de *Streptomyces griseoviridis*, développé par Kemira Oy, a été utilisé pour protéger les plantes contre l'infection au *Fusarium* et à l'*Alternaria* (Lahdenpera *et al*, 1991). Broadbent *et al* (1971) et Knauss (1976) ont établi que plusieurs streptomycètes pourraient inhiber la croissance des champignons du genre *Pythium* et *Phytophthora* spp. grâce à la production d'antibiotiques. Selon Crawford *et al* (1993), la production d'antibiotique est très souvent associée au pouvoir de contrôle biologique. Malgré le

fait que plusieurs actinomycètes sécrètent des chitinases, des glucanases et d'autres enzymes hydrolytiques extracellulaires, aucune corrélation n'a encore été établie jusqu'ici entre la production d'enzymes hydrolytiques et l'aptitude d'être un agent de contrôle biologique chez les actinomycètes. Valois *et al* (1996) ont montré que les β -glucanases produites par les actinomycètes antagonistes du *Phytophthora fragariae* var *rubi* étaient actives sur le mycélium vivant de ce champignon qu'elles lysaient en l'absence d'antibiotiques et pouvaient par le fait même, jouer un rôle significatif dans la suppression des maladies de plantes.

Il ya quelques années, les β -1,3- et β -1,4-glucanases ont été rapportées chez les actinomycètes (Bielecki et Galas, 1991; Gilbert *et al*, 1995). Cependant, ce n'est que tout récemment, dans notre laboratoire, que des travaux ont permis de purifier et de caractériser une β -1,6-glucanase chez l'actinomycète *Streptomyces* sp. EF-14, une souche capable de lyser complètement le mycélium de *Phytophthora*. Quinze acides aminés de la portion N-terminale de cette enzyme ont été déterminés: ADPTAQVWVTTDPGA (Fayad, 1997). La comparaison de cette séquence à celles des bases de données GenBank et SwissProt (Altschul *et al*, 1990) n'a révélé aucune homologie significative avec d'autres protéines. Ce qui nous laisse croire que cette β -1,6-glucanase appartient à une nouvelle classe de protéine. Ainsi, nous avons opté pour le clonage du gène codant pour cette β -1,6-glucanase, pour permettre des études moléculaires plus approfondies, afin de mieux comprendre ses mécanismes d'action et son implication dans les phénomènes d'antibiose.

Outre l'implication dans l'antagonisme contre les champignons phytopathogènes, plusieurs applications potentielles peuvent être attribuées à la β -1,6-glucanase. Elle pourrait être utilisée dans la lyse enzymatique et la désintégration des cellules microbiennes, méthode préférable à la rupture chimique ou mécanique, pour permettre ainsi la récupération des produits synthétisés par ces microorganismes. De tels produits incluent les émulsifiants, les stabilisants, les vitamines, les colorants, les enzymes et plusieurs protéines. Selon Kofod *et al* (1998), la

pustulanase qui est une β -1,6-glucanase pourrait par exemple être utilisée pour extraire des mannoprotéines (bioémulsifiants) à partir des parois cellulaires de levure telle que *Saccharomyces cerevisiae*. Dans le processus de fabrication de vins et de jus, la filtration pourrait être nettement améliorée avec l'utilisation des β -1,6-glucanases puisque celles-ci préviendraient la croissance des microorganismes tels que *Botrytis cinerea* infectant les grappes de raisins (Kofod *et al*, 1998). Une autre importante application de la β -1,6-glucanase serait la production des protoplastes de levures et de champignons puisque la préparation et la régénération des protoplastes de tels organismes sont très importantes pour l'étude de fusion, de transformation et de clonage (Kofod *et al*, 1998).

Bien que plusieurs β -1,6-glucanases soient caractérisées du point de vue biochimique, seulement deux gènes codant pour des endo- β -1,6-glucanases d'origine fongique ont été clonés et séquencés (Lora *et al*, (1995); Kofod *et al*, (1998)). Jusqu'à présent aucun article n'a caractérisé du point de vue moléculaire, une β -1,6-glucanase bactérienne. Ce qui accroît encore plus l'intérêt de cloner ce gène chez l'actinomycète *Streptomyces* sp. EF-14, qui est une excellente productrice de cette enzyme. La comparaison de la β -1,6-glucanase provenant de EF-14 (tableau I) avec celle provenant du champignon *Trichoderma harzianum* (De la Cruz *et al*, 1995), qui est la mieux caractérisée moléculairement, montre que ces deux enzymes sont différentes aussi bien au niveau des propriétés biochimiques (poids moléculaire de 66 KDa chez la bactérie contrairement à 43 KDa chez le champignon) qu'au niveau de la structure moléculaire (séquences N-terminales très différentes). Ces deux enzymes sont cependant similaires sur le mode d'action endo-glucanolytique et ne sont pas capables d'hydrolyser un dimère de glucose tel le gentiobiose. La β -1,6-glucanase provenant de EF-14 a également été comparée à la pustulanase qui est une enzyme ayant une activité β -1,6-glucanase dont le gène vient d'être cloné et séquencé par Kofod *et al* (1998). Il ya très peu d'informations disponibles sur certains aspects biochimiques de cette enzyme. Toutefois, son mode d'action est du type endo-glucanolytique et son poids moléculaire a été estimé à 50 KDa. C'est une protéine qui est donc moins grosse que

Tableau I: Comparaison des aspects physico-chimiques et moléculaires des β -1,6-glucanases provenant de *Streptomyces* sp. EF-14 et de *Trichoderma harzianum*

	<i>Streptomyces</i> sp. EF-14	<i>T. harzianum</i>
Organisme	bactérie	champignon
PM	66 KDa	43 KDa
Activité (écorce de levure)	non-lytique	lytique
Produit final (substrat pustulane)	glucose et dimères (gentiobiose)	dimères et trimères
Séquence N-terminale	ADPTAQVWVTPDGA	FEPALASGKT

la β -1,6-glucanase de EF-14. Par contre, cette pustulanase a un PM plus élevé que celui de la première endo- β -1,6-glucanase purifiée par De la Cruz *et al* (1995) chez le même organisme *Trichoderma harzianum*.

Le but général du projet de recherche était de cloner le gène codant pour une β -1,6-glucanase provenant de *Streptomyces* sp. EF-14 et de l'exprimer dans *Streptomyces lividans* TK-24 qui est un hôte de clonage bien connu chez les actinomycètes, excellents sécréteurs d'enzymes. La stratégie utilisée pour atteindre l'objectif principal est basée sur une approche relativement récente, la génétique inverse. Contrairement à la démarche de la génétique classique, on travaille à l'envers c'est-à-dire qu'on remonte de la protéine vers le gène. En effet, la séquence N-terminale de la β -1,6-glucanase purifiée chez EF-14 a permis de synthétiser un oligonucléotide qui a été utilisé dans le criblage de la banque génomique de *Streptomyces* sp. EF-14, afin de sélectionner le clone codant pour cette enzyme.

CHAPITRE 1

MATERIEL ET METHODES

1.1 Souches bactériennes et plasmides

Toutes les souches bactériennes et les plasmides utilisés dans cette étude sont listés au tableau II. La souche d'*Escherichia coli* DH5 α F' (Gibco BRL) a servi à la propagation des plasmides pUC119 (American Type Culture Collection) et pFD666 (Denis et Brzezinski, 1992). *E. coli* DH10B (Gibco BRL) et XLI-Blue MRF' (Stratagene) ont été utilisées pour la construction de la banque génomique de *Streptomyces* sp. EF-14, avec respectivement pFD666 et pUC119 comme vecteurs. La souche de *E. coli* JM109 F' (Promega) a servi à la préparation des plasmides pBluescript SKII⁺/₋ (Stratagene), à la production des ADNs simple brin lorsqu'elle est infectée avec le phage helper R408 (Promega) et à des manipulations subséquentes des clones. *Streptomyces* sp. EF-14 provenait de la collection d'actinomycètes non pathogènes isolés par Faucher *et al* (1992). L'hôte de clonage chez les actinomycètes a été *Streptomyces lividans* TK-24 dont la production en β -1,6-glucanase était très faible. Cette souche est une gracieuseté de D. A. Hopwood de John Innes institute, Norwich, Angleterre.

1.2 Milieux de culture

1.2.1 Milieux de propagation des souches bactériennes

Le milieu LB (Sambrook *et al*, 1989) a servi à la croissance, la préparation des cellules compétentes et la transformation des différentes souches de *E. coli* énumérées dans la tableau II, selon les conditions et les méthodes décrites par Sambrook *et al* (1989). Les souches de *E. coli* portant les plasmides pUC119 et pFD666 recombinants ont été cultivées dans le milieu TB (Sambrook *et al*, 1989). Le milieu de culture TYP (Promega) supplémenté de 125 μ g/ml d'ampicilline a été utilisé pour la production d'ADNs des clones, dans le but d'obtenir les

Tableau II: caractéristiques des souches bactériennes et des plasmides utilisés pour le clonage du gène de la β -1,6-glucanase.

SOUCHES/PLASMIDES	CARACTERISTIQUES	SOURCE
<i>E. coli</i> DH5 α F'	Haute efficacité de transformation	Gibco BRL
<i>E. coli</i> DH10B	Haute efficacité de transformation	Gibco BRL
<i>E. coli</i> XLI-BLUE MRF'	Tet ^r	Stratagene
<i>E. coli</i> JM109 F'	Hôte de sous-clonage	Promega
<i>Streptomyces</i> sp. EF-14	Meilleur producteur de β -1,6-glucanase	Université de Sherbrooke
<i>S. lividans</i> TK-24	Hôte de clonage chez les actinomycètes	D. A. Hopwood (Norwich, Angleterre)
pUC119	Amp ^r , origine f1 du phage helper	ATCC ¹
pFD666	Kan ^r /Neo ^r vecteur-navette	Denis et Brzezinski (1992)
pBluescript SKII ^{+/−}	Amp ^r , origine f1 du phage helper	Stratagene

¹ ATCC: American Type Culture Collection

séquences en ADN. Chez les actinomycètes, tous les milieux utilisés étaient ceux décrits par Hopwood *et al* (1985), dans les mêmes conditions de croissance, sauf indication contraire. *Streptomyces* sp. EF-14 a montré une bonne croissance dans le milieu YME (Yeast Malt Extract) liquide. La sporulation s'est effectuée sur le même milieu additionné de 1.5% d'agar (Difco). *S. lividans* TK-24 a été cultivé dans le milieu TSB (Tryptic Soy Broth) pour la préparation des protoplastes. La sporulation s'est effectuée sur le milieu SLM3 pendant environ 4 jours d'incubation à 30°C et les spores ont été conservés à -20°C dans du glycérol (20%).

1.2.2 Antibiotiques utilisés pour la sélection des transformants

Afin de sélectionner les souches de *E. coli* DH10B transformées avec le produit de ligation du vecteur pFD666/*Bam*HI et des inserts d'ADNs coupés par *Bgl*II, 50 µg/ml de kanamycine (Sigma) étaient ajoutés dans les milieux de culture liquides et solides. Les transformants de *E. coli* XLI-Blue et JM109 F' avec les vecteurs pUC119 et pBluescript SKII⁺ ou SKII⁻ étaient sélectionnés sur des milieux LB contenant respectivement 100 µg/ml et 125 µg/ml d'ampicilline (Sigma). Une concentration de 50 µg/ml de X-gal était ensuite ajoutée dans tous les pétris d'ampicilline et 20 µg/ml d'IPTG étaient ajoutés dans les pétris de sélection des transformants XLI-Blue seulement. Chez les actinomycètes, la kanamycine a été ajoutée dans le milieu TSB liquide à raison de 50 µg/ml et dans l'agar de surface du milieu de régénération des protoplastes R2YE (Hopwood *et al*, 1985) à une concentration de 1,25 mg/ml (Denis et Brzezinski, 1992).

1.2.3 Traitement de *E. coli* DH10B à la coumermycine A₁

Afin d'éliminer le plasmide pMH31 (vecteur pFD666 portant le gène de la β-1,6-glucanase) de la souche de *E. coli* DH10B, une culture liquide de DH10B(pMH31) dans du TB + kan 50 µg/ml a été incubée pendant 18 heures à 37°C. Une dilution de 10⁻⁴ de cette culture a

été effectuée dans 2 ml de LB contenant de la coumermycine A₁ (Sigma) à différentes concentrations: 1 µg/ml, 2 µg/ml, 5 µg/ml et 10 µg/ml. Après 18 heures d'incubation à 37°C, chaque culture a été striée par épuisement sur un milieu LB solide sans antibiotique et LB solide +kan 50 µg/ml. Après 18 heures d'incubation, 10 colonies provenant du pétri ayant la concentration la plus élevée en coumermycine A₁ ont été repiquées en culture liquide (2 ml) pour effectuer une extraction plasmidique afin de vérifier l'élimination de pMH31.

1.2.4 Détection de l'activité β -1,6-glucanase sur boîte de pétri

Les banques génomiques partielle et totale de *Streptomyces* sp. EF-14 dans *E. coli* XLI-Blue et DH10B étaient étalées sur le milieu T-PUST qui contenait 6 g/L de TSB, 10 g/L de pustulane de *Umbilicaria papullosa* (Calbiochem) et 1,5% d'agar, pour la détection des clones β -1,6-glucanases positifs. Après avoir autoclavé ce milieu, 0,02 g/ml d'hydrolysate de caséine (Difco) y avait été ajouté pour améliorer la croissance des transformants de *E. coli*. Pour la confirmation de l'activité β -1,6-glucanase, le plasmide pMH31 a été réintroduit dans DH10B et cette souche a été ensuite étalée sur le milieu M9-PUST contenant 10 g/L de pustulane dans le milieu minimum M9 modifié (0,6% Na₂HPO₄; 0,3% KH₂PO₄; 0,05% NaCl; 0,1% NH₄Cl et 1,5% d'agarose) (Promega). Chez les streptomycètes, le milieu minimum constituant le milieu M-PUST a été celui décrit par Hopwood *et al* (1985). DH10B(pMH31) était également étalée sur des milieux minimum contenant différentes sources de carbone telles que la laminarine de *Laminaria digitata* (0,4% p/v) et la cellulose (0,4% p/v), disponibles chez Sigma, pour vérifier si cette souche avait également des activités β -1,3- et β -1,4-glucanases.

1.2.5 Milieux de production de la β -1,6-glucanase

Différents milieux ont été testés pour la production de la β -1,6-glucanase à partir des clones de *S. lividans* TK-24: le milieu MPA-pustulane contenant 4,5 g/L K₂HPO₄; 0,2 g/L

MgSO₄.7H₂O; 0,01 g/L FeSO₄.7H₂O; 0,01 g/L CaCl₂.2H₂O; 1 ml/L de solution de micro éléments (Hopwood *et al*, 1985); 0,1 g/L de sulfate d'ammonium; 2 g/L d'extrait de malt; 10 g/L de pustulane; le milieu MBSM-amidon dont la composition est la suivante: 2 g/L de L-asparagine, 0,5 g/L MgCl₂.6H₂O; 1 g/L NaCl; 3 g/L K H₂PO₄; 0,5 g/L KH₂PO₄; 1 mg/L FeCl₂.6H₂O; 30 g/L (NH₄)₂SO₄; 20 g/L d'amidon et le milieu minimum (Hopwood *et al*, 1985) supplémenté de chacun des substrats suivants: 0,5% de *Candida utilis* pour le milieu CU, 1% de pustulane pour le milieu PU puis 2% d'amidon pour le milieu AM. La levure *Candida utilis* a été utilisée dans le milieu CU à cause de la similitude de sa paroi cellulaire à celle de *Phytophthora*, paroi cellulaire riche en β-glucanes de différentes sortes: β-1,3-glucanes, β-1,6-glucanes et β-1,3-/β-1,6-glucanes hautement branchés (Gopal *et al*, 1984).

1.3 Préparation des cellules compétentes et des protoplastes

Pour l'électroporation, les cellules ont été rendues compétentes puis transformées par électroporation selon les directives du manufacturier (Biorad). Une culture de *E. coli* (50 ml) dont la D.O. à 600 nm se situait entre 0,5 et 0,7 a été récoltée et centrifugée pendant 10 min à 4°C. Les cellules ont été resuspendues dans le même volume de glycérol (10%) froid puis centrifugées pendant 10 min. Deux étapes de lavage ont été effectuées, avec 25 ml de glycérol au premier tour et 1 ml au deuxième tour. Les cellules ont été resuspendues dans un volume final de 0,125 ml de glycérol (20%) pour obtenir une concentration de 1 à 3 x 10¹⁰ cellules/ml et ont été gardées à -20°C, en aliquot de 40 µl dans des tubes de 1,5 ml en polypropylène. Pour la transformation, 2 µl d'ADN ont été ajoutés à 40 µl de cellules dégelées et le mélange a été transféré dans une cuvette à électroporation (0,2 cm) gardée à 4°C. La cuvette a ensuite été soumise à une pulsion électrique dans l'appareil à électroporation de Biorad, sous des conditions de 25 µF, 200 Ohms et 2,5 kV. Les cellules transformées ont été incubées à 37°C pendant une heure après l'ajout de 1 ml de milieu SOC liquide (2% de Bacto-tryptone; 0,5% d'extrait de levure; 10mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄ et 20 mM de glucose) et

étalées ensuite sur le milieu de sélection contenant l'antibiotique approprié.

Les protoplastes de *S. lividans* TK-24 ont été préparés, transformés et soumis à la régénération sur le milieu R2YE comme décrit par Hopwood *et al* (1985) sauf que l'agar de surface du R2YE a été remplacé par un milieu sélectif contenant 1,25 mg/ml de kanamycine et est composé de 10 g/L de pustulane et 0,1 g/L de TSB dans 50 mM de tampon acétate de sodium pH 5,5.

1.4 Manipulation de l'ADN et construction de la banque génomique

1.4.1 Isolement de l'ADN génomique

L'ADN génomique de *Streptomyces* sp. EF-14 a été isolé et purifié d'après le protocole de Hopwood *et al* (1985) utilisant le mélange "2X Kirby".

1.4.2 Transfert de type Southern et hybridation

L'ADN de *Streptomyces* sp. a été digéré par différentes enzymes de restriction (*ScaI*, *BglII*, *NotI*, *PstI*, *PvuII*, *MluI* et *NruI*) utilisées selon les directives du fabricant (Pharmacia). Les fragments d'ADN résultants de ces digestions ont ensuite été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8 % dans du tampon TBE (Tris-Borate-EDTA) comme décrit par Sambrook *et al*, (1989). Selon les instructions du fabricant, les fragments d'ADN ont été transférés toute la nuit sur des membranes de nylon Hybond-N (Amersham) dans une solution de transfert constituée de 1,5 M NaCl et 0,25 M NaOH. Les membranes ont été ensuite rincées avec du 2X SSC (17,5% NaCl; 8,8% citrate de sodium; pH ajusté à 7,0) puis traitées pendant 10 min à la chaleur (80°C) pour fixer les fragments d'ADN. La préhybridation et l'hybridation ont été effectuées selon un protocole modifié de Sambrook *et al* (1989). En fait, la formamide dans les

solutions de préhybridation et d'hybridation, a été tout simplement remplacée par de l'eau distillée et l'ADN de sperme de saumon a été remplacé par l'ADN de sperme de hareng. La préhybridation s'est effectuée à 42°C pendant une heure, suivie de l'hybridation qui a duré, environ 16 heures à la même température. A moins d'indication contraire, les membranes de nylon ont été ensuite soumises à deux lavages, un de 30 min et l'autre de 15 min, avec une solution contenant 0,2X SSC et 0,1% SDS. Les sondes utilisées, de façon indépendante, pour l'hybridation étaient les oligonucléotides KF-1 (5'-GCSCAGGTSTGGGTSAC-3') hétérogène car il était constitué d'un mélange de 8 séquences différentes codant toutes pour la même séquence d'acides aminés, la lettre S remplaçant un nucléotide G ou C et KF-2 (5'-ACCGCCCAGGTCTGGGTCAC-3') inspiré du premier en remplaçant les codons dégénérés par les codons les plus fréquents selon l'usage des codons chez les actinomycètes (Bibb *et al*, 1984). Ces oligonucléotides ont été synthétisés à partir de la séquence N-terminale de la β -1,6-glucanase constituée de 15 acides aminés (ADPTAQVWVTTPDGA). Chaque oligonucléotide (100 pmoles) a été marqué au γ -³²P-dATP (Amersham) selon le protocole de marquage décrit par Sambrook *et al* (1989) et a été ensuite purifié à l'aide de la microcolonne G-50 (Pharmacia) pour séparer la radioactivité libre de la sonde. L'activité spécifique des sondes a été déterminée au compteur à scintillation (Beckman), par effet Cerenkov. Après l'hybridation, les membranes lavées ont été autoradiographiées pendant une durée minimale de 48 heures à -70°C, en utilisant un film XRP (Kodak) dans une cassette (Wolf H-Ray corp.) contenant des écrans intensifiants.

1.4.3 Isolement des ADNs plasmidiques

Les plasmides ont été isolés des souches de *E. coli* par la méthode de lyse alcaline (Sambrook *et al*, 1989). Chez les Streptomycètes, l'extraction d'ADN plasmidiques s'est faite suivant un protocole modifié de Hopwood *et al* (1985), celui de l'extraction d'ADN génomique avec le mélange "2X Kirby". La procédure est la suivante: une culture dense (25 ml) de *S. lividans* TK-24 transformée avec le plasmide pFD666, culture jeune d'environ 40 heures, a été

centrifugée pendant 15 min à 4000 X g et le culot a été resuspendu dans 3 ml de solution de lysozyme (2 mg/ml de lysozyme dans du sucrose 0,3 M, du Tris-Cl 25 mM pH 8, et de l'EDTA 25 mM pH 8). Après une incubation de 10 min à 37°C, un volume de 4 ml du mélange "2X Kirby" a été rajouté et le tout a été brassé au vortex pendant une minute. Après cette étape, une solution TE (Tris-EDTA) et les solutions II et III de Sambrook *et al* (1989) ont été utilisées. En fait, pour un volume de 5 ml après le mélange "2X Kirby", 1 ml de solution TE et 8 ml de solution II ont été ajoutées successivement puis mélangées délicatement par inversion. Après avoir laissé le mélange 10 min sur glace, la solution III (3 ml) a été rajoutée et mélangée par inversion. La préparation a été gardée au moins 45 min sur glace puis centrifugée pendant 10 min à 4000 X g. Le surnageant a été récupéré et mélangé au même volume de phénol:chloroforme (1:1) puis centrifugé à nouveau pendant 10 min. La phase aqueuse récoltée a ensuite subi une précipitation avec 2 volumes d'éthanol. Après 10 min de centrifugation, l'ADN précipité a été séché, resuspendu dans une solution de TE (Tris-EDTA) et traité à la ribonucléase à une concentration finale de 100 µg/ml.

1.4.4 Construction de la banque génomique de *Streptomyces* sp. EF-14

Le plasmide pUC119 a servi à la construction de la banque génomique partielle de *Streptomyces* sp. EF-14 dans *E. coli* XLI-Blue et pFD666 a servi à la construction de la banque génomique totale dans *E. coli* DH10B. Les deux plasmides ont été digérés par l'enzyme de restriction *Bam*HI (Pharmacia) choisie parmi les enzymes présentes dans le site de clonage multiple (SCM) des deux plasmides, puis ils ont été déphosphorylés à l'aide de la phosphatase alcaline CIAP (Calf intestinal alcalin phosphatase) de Promega, en suivant le protocole de déphosphorylation décrit par Sambrook *et al* (1989). Des fragments d'ADN (5 à 20 Kb) digérés par *Bam*HI ont été isolés du gel d'agarose TAE (Tris-Acétate-EDTA) 0,8% (Sambrook *et al*, 1989) selon les instructions du fabricant de la trousse " Gene Clean" (Bio 101, Inc.). Ces fragments d'ADN ont été insérés dans le plasmide pUC119 qui a été linéarisé et déphosphorylé

à l'aide de la T₄ ligase (Promega). La ligation s'est effectuée pendant au moins 16 heures à 15°C selon un rapport (insert:vecteur) de 3:1. Les produits de ligation ont été précipités à l'éthanol et 135 ng ont été utilisés pour l'électroporation de 40 µl de cellules compétentes. Après une heure d'incubation, les cellules ont été étalées sur le milieu T-PUST opacifié contenant 100 µg/ml d'ampicilline. Les pétris ont été incubés à 37°C pendant une semaine pour sélectionner les clones producteurs de la β-1,6-glucanase. Pour la construction de la banque génomique totale de *Streptomyces* sp. EF-14 dans la souche de *E. coli* DH10B, les fragments d'ADN de taille moyenne de 12,5 Kb, résultant de la digestion totale de l'ADN génomique de *Streptomyces* sp. EF-14 par l'enzyme *Bgl*III ont été insérés dans le plasmide pFD666 digéré par l'enzyme *Bam*HI et déphosphorylé. Les conditions de ligation étaient les mêmes que celles de la ligation précédente. L'électroporation des cellules compétentes s'est effectuée avec 125 ng de ce mélange. Les cellules incubées à 30°C pendant une heure ont été étalées sur le milieu T-PUST supplémenté de kanamycine (50 µg/ml). Les pétris ont été incubés à 30°C pendant 4 jours, pour la détection des clones producteurs de la β-1,6-glucanase.

1.5 Criblage de la banque génomique

Deux méthodes de criblage ont été utilisées pour identifier les clones positifs pouvant coder pour l'enzyme d'intérêt: la détection phénotypique et la technique d'hybridation avec l'oligonucléotide radioactif.

1.5.1 Détection phénotypique

C'est une technique qui consiste à étaler les cellules de *E. coli* transformées par électroporation avec l'ADN génomique sur les milieux T-PUST et M9-PUST opacifiés afin de détecter les colonies créant autour d'elles une zone de dégradation claire. Ces deux milieux lorsque coulés dans des boîtes de pétri, étaient gardés 48 heures à température de la pièce puis

transférés à 4°C où ils s'opacifiaient après environ une semaine. Lorsque les milieux T-PUST et M9-PUST étaient immédiatement utilisés après leur préparation, après 4 à 7 jours d'incubation des cellules électroporées à 30°C, une coloration au rouge congo 0,2% (Sigma) était effectuée pendant environ 10 min, suivie d'une décoloration avec une solution de NaCl (1M) selon le protocole modifié de Bégin (1983). En fait, la concentration du rouge congo qui était de 0,1% dans ce protocole a été augmentée à 0,2% pour notre étude. La coloration au rouge congo a également été utilisée pour la confirmation des activités β -glucanases par les clones lorsqu'ils étaient repiqués sur du milieu minimum solide additionné de laminarine ou de cellulose comme source de carbone.

1.5.2 Criblage par hybridation

Pour cribler les clones potentiels de la β -1,6-glucanase par hybridation, c'est la technique "SIB Selection" qui a été utilisée. Cette technique a déjà été utilisée par Jones et Hopwood (1984), pour une sélection par élimination de populations via des essais enzymatiques. Dans notre étude, le principe consistait à transformer *E. coli* DH10B avec une population de plasmides issus de la banque génomique totale de *Streptomyces* sp. EF-14, à amplifier ces plasmides afin de les hybrider avec la sonde KF-1 pour éliminer certaines populations de façon sélective.

Afin de sélectionner les populations plasmidiques ayant une séquence en ADN homologue à la sonde KF-1 utilisée pour l'hybridation, la souche DH10B a été transformée par électroporation avec 245 ng du mélange de ligation des inserts d'ADN *Bgl*III avec le vecteur pFD666 constituant la banque génomique *Bgl*III de *Streptomyces* sp. EF-14. Les cellules ainsi transformées étaient divisées en 20 populations étalées sur le milieu solide LB + kan (50 μ g/ml), dans 20 boîtes de pétri. Après 18 heures d'incubation à 30°C, chaque population était récoltée dans 3 ml de LB + kan (50 μ g/ml) puis réincubée à 30°C une heure additionnelle, pour être amplifiée. Les ADNs plasmidiques ont été extraits, digérés par l'enzyme de restriction *Pst*I

choisie dans le SCM de pFD666, soumis à l'électrophorèse sur gel d'agarose 0,8% puis transférés sur des membranes de nylon. Une hybridation a été effectuée avec la sonde KF-1 et les populations ayant émis un signal plus fort sur l'autoradiogramme ont été sélectionnées. L'ADN des populations choisies a été utilisé pour électroporer les cellules compétentes et chaque population a été divisée en 7 sous populations qui ont été soumises aux mêmes étapes d'amplification, d'extraction d'ADN, de digestion, de transfert puis d'hybridation. A la dernière étape de sélection, les clones de chaque sous population ont été analysés individuellement selon les mêmes étapes.

1.6 Identification et séquençage des fragments d'ADN des clones homologues à l'oligonucléotide KF-1

1.6.1 Identification de la région d'homologie des clones avec KF-1

Les clones ont été digérés avec des enzymes de restriction, provenant de sources variées (Pharmacia, Boehringer Mannheim et Biolabs), fragmentant l'ADN en plusieurs morceaux. Ces fragments d'ADN ont été ensuite séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%, transférés sur membrane de nylon puis hybridés avec la sonde KF-1. Les plus petits fragments d'ADN donnant un signal étaient ainsi choisis pour l'étape subséquente. Certains fragments d'ADN étaient identifiés directement par la technique de SIB Selection expliquée ci-haut dans la section 1.5.2.

1.6.2 Production d'ADN sb

Les fragments d'ADN ayant une homologie avec la sonde ont été sous clonés dans les plasmides pBluescript SKII⁺ et SKII⁻ qui possèdent l'origine de répllication du phage helper. Les cellules compétentes JM109F' ont été électroporées avec les plasmides recombinants puis ont

étalées sur du milieu LB+amp (125 µg/ml) et X-gal (50 µg/ml). Les pétris ont été incubés à 30°C pendant 48 heures et les colonies blanches ont été repiquées en milieu liquide pour être infectées avec le phage R408, selon le protocole du fournisseur (Promega), afin de récolter l'ADN sb. Une légère modification a été apportée au protocole de production du simple brin de Promega: la croissance des cellules infectées s'est effectuée à 30°C au lieu de 37°C comme c'est indiqué dans le protocole.

1.6.3 Séquençage d'ADN

La séquence nucléotidique de l'ADN sb a été déterminée à l'aide du séquenceur automatique ALF de Pharmacia. Les réactions de séquençage ont été effectuées en utilisant des amorces fluorescentes et les produits de la trousse "Sequence kit" selon les instructions du fournisseur (Pharmacia). L'amorce de séquençage universelle, un oligonucléotide s'hybridant à une séquence d'ADN proche de la région à sites de clonage multiple de tous les vecteurs dérivés du phage filamenteux M13, a été utilisée pour amorcer le séquençage de l'ADNsb produit avec le plasmide pBluescript SKII⁺. Pour amorcer le séquençage de l'ADN sb produit avec pBluescript SKII⁻, c'est l'amorce inverse, un oligonucléotide s'hybridant à une séquence du promoteur du gène *lacZ* des vecteurs dérivés du phage M13 qui a été utilisé.

1.7 Analyse informatique des séquences d'ADN

Pour analyser les phases de lecture ouverte dans une séquence codante, c'est le programme "Frame" (gracieusement fourni par le Dr. F. Denis, IRCM, Montréal) qui a été utilisé. Les séquences en acides aminés déduites ont été comparées à celles contenues dans les bases de données SwissProt et GenBank (Altschul *et al* (1990, 1997); Gish et States, (1993)). Certaines des séquences d'ADN déterminées ont été soumises au système d'analyse des séquences de l'IRCM (Montréal), basé sur le programme informatique GCG développé à

l'université de Wisconsin.

1.8 Transfert de la banque génomique de *Streptomyces* sp. EF-14 dans *S. lividans* TK-24

1.8.1 Transformation des protoplastes avec la banque amplifiée

Les cellules compétentes de *E. coli* DH10B électroporées avec l'ADN de la banque génomique totale et incubées environ 18 heures à 30°C ont été récoltées puis amplifiées dans 100 ml de LB + kan (50 µg/ml) pendant une heure, afin d'extraire les ADNs plasmidiques constituant toute la banque amplifiée. Les protoplastes de *S. lividans* TK-24 ont été transformés selon la technique de Hopwood *et al* (1985), avec 1,5 µg d'ADN de la banque plasmidique. La régénération s'est effectuée sur le milieu R2YE pendant environ 20 heures puis l'agar de surface, remplacé par de l'agarose 0,3%, contenu dans 50 mM de tampon acétate de sodium pH 5,5 additionné de pustulane (10 g/L) autoclavé, a été ajouté sur les cellules régénérées. Les pétris ont été incubés environ 4 jours pour la sélection des clones d'intérêt.

1.8.2 Transfert de pMH31 dans *S. lividans* TK-24

Le plasmide de pMH31 amplifié, issu de *E. coli* DH10B, a été transféré dans *S. lividans* TK-24 de la même façon que le transfert de la banque génomique totale *Bgl*II de *Streptomyces* sp. EF-14, à la seule différence que l'agar de surface était constitué de 0,3% de TSA (Tryptic Soy Agar).

1.9 Production de la β -1,6-glucanase par les clones

E. coli DH10B contenant pMH31 a été inoculée dans 3 ml de TB + kan (50 µg/ml) et a été incubée environ 16 heures à 30°C. Le milieu de culture a été ensuite centrifugé et les cellules

ont été resuspendues dans du tampon acétate de sodium 50 mM pH5,5. Les cellules soniquées pendant 40 sec à 4°C à l'aide d'un sonicateur provenant de Quigley-Rochester inc., ont été centrifugées pendant 5 min et le surnageant (100 µl) a été récolté pour le dosage de l'activité β -1,6-glucanase selon la méthode de Nelson-Somogyi (Spiro, 1966).

Les protéines périplasmiques de la souche de *E. coli* contenant le plasmide pMH31 ont été extraites selon un protocole modifié de Manoil et Beckwith (1986). Une culture de 10 ml de cette souche en phase exponentielle a été centrifugée à 4°C pendant 5 min à 4000 X g. Les cellules ont été resuspendues dans 600 µl de tampon de sphéroplastisation froid constitué de 100 mM tris-Cl pH 8,0; 0,5 mM EDTA; 0,5 mM de sucrose et 20 µg/ml de PMSF. Après un repos de 5 min sur glace, le mélange a été centrifugé à nouveau pendant 5 min et les cellules ont été récupérées et réchauffées à température de la pièce. Des volumes de 600 µl d'eau froide et 30 µl de MgCl₂ 20 mM y ont été ajoutés. La suspension ainsi obtenue a été gardée une minute sur glace avant d'être centrifugée pendant 3 min. Le surnageant contenant les protéines périplasmiques a été récupéré et concentré à l'aide du dispositif centricon-10 (Amicon, inc.). Le produit de concentration (100 µl) a été utilisé pour le dosage des activités β -1,3- et β -1,6-glucanases selon la méthode de Nelson-Somogyi (Spiro, 1966).

Chez les clones de *S. lividans* TK-24, l'essai de production de l'enzyme a été effectué avec différents milieux. Des spores de *S. lividans* TK-24(pMH31) ont été inoculés dans 25 ml de chacun des milieux MBSM- amidon et MPA-pustulane supplémentés de kanamycine (50 µg/ml) puis incubés pendant 96 heures à 30°C. Les spores de *S. lividans* TK-24(clo1) et *S. lividans* TK-24(pFD666) ont également été incubés à 30°C pendant 96 heures dans les milieux CU, PU et AM décrits plus haut dans la section 1.2.5. Pour les 3 clones, après 24, 48, 72 et 96 heures, le milieu de croissance a été prélevé à raison de 1 ml puis centrifugé 5 min et le surnageant a été conservé pour effectuer le dosage de l'activité β -1,6-glucanase.

1.10 Détermination des sucres réducteurs selon la méthode de Nelson-Somogyi

L'activité β -1,6-glucanase des surnageants de culture a été mesurée en estimant la quantité de sucres réducteurs produits pendant la réaction enzyme-substrat. Le substrat utilisé à cet effet était le pustulane (2,5 mg/ml). La méthode utilisée pour déterminer la quantité de sucres réducteurs a été celle de Nelson-Somogyi (Spiro, 1966). La réaction était faite dans un volume total de 500 μ l contenant 20, 30, 40 ou 100 μ l de surnageant de culture avec respectivement 480, 470, 460 ou 400 μ l de pustulane (2,5 mg/ml dans 50 mM de tampon acétate de sodium au pH optimal de 5,5). Le mélange réactionnel a été incubé pendant 10 min à la température optimale de 50°C (Fayad, 1997). Un volume de 500 μ l de réactif CA (cuivre alcalin) a ensuite été ajouté. Ce qui arrête la réaction enzymatique. Les tubes contenant le mélange réactionnel ont été bouillis pendant 15 min puis refroidis. 500 μ l de réactif AM (arsenomolybdique) et 4,5 ml d'eau ont été ajoutés comme c'est décrit dans le protocole de dosage de sucres réducteurs. La lecture spectrophotométrique des échantillons a été effectuée à 520 nm. La composition des réactifs CA et AM a été décrite par Spiro (1966). Des échantillons de référence contenant du tampon acétate de sodium à la place du surnageant de culture étaient préparés en parallèle avec les tubes de réaction. Pour doser l'activité β -1,3-glucanase, le pustulane était remplacé par la laminarine (2,5 mg/ml).

Pour calculer l'activité enzymatique, la quantité de sucres réducteurs dosée dans les échantillons de référence était soustraite de celle du mélange réactionnel contenant le surnageant de culture. Une unité d'activité β -glucanase correspond à la quantité d'enzyme requise pour libérer l'équivalent de 1 μ mole de sucres réducteurs pendant une minute dans les conditions de réaction spécifiées ci-haut.

1.11 Détermination des sucres réducteurs à l'aide du réactif PAHBAH

Pour mesurer la quantité de sucres réducteurs libérés par la β -1,6-glucanase purifiée chez *Streptomyces* sp. EF-14, c'est le protocole modifié de Schep *et al* (1984) et Lever (1973), se servant du réactif PAHBAH qui a été utilisé. Cette méthode de dosage était huit fois plus sensible que celle de Nelson-Somogyi décrite ci-haut dans la section 1.10 (Fayad, 1997). En fait, le réactif PAHBAH (0,5%) a été constitué en mélangeant 5 ml de chacun des solutions suivantes: 1M Na_2SO_3 ; 0,2M CaCl_2 ; 0,5M citrate trisodique et 5M NaOH, et le volume a été ajusté à 100 ml avec de l'eau distillée. 0,5 g de PAHBAH (Sigma) a été dilué dans ce mélange préparé immédiatement avant le dosage. Pour effectuer le dosage, 50 μl de mélange réactionnel d'un temps d'incubation précis ont été ajoutés à 450 μl de tampon sodium acétate 50 mM pH 5,5 et à 1 ml de réactif PAHBAH (0,5%). Les tubes réactionnels et les tubes de référence qui ont été préparés de la même façon mais en remplaçant le mélange réactionnel par du pustulane (2,5 mg/ml), ont été placés 10 min dans de l'eau bouillante puis refroidis sur glace. La densité optique a été ensuite lue à 420 nm. Le calcul de la quantité de sucres réducteurs libérés a été effectué en fonction d'une courbe standard établie avec du glucose.

1.12 Produits d'hydrolyse de différents substrats par la β -1,6-glucanase purifiée chez *Streptomyces* sp. EF-14

La β -1,6-glucanase provenant de *Streptomyces* sp. EF-14, purifiée dans notre laboratoire, a été utilisée à raison de 7,5 mU pour des digestions partielles de différents substrats tels que: le pustulane, la laminarine et le gentiobiose, afin de doser l'activité enzymatique et analyser les produits d'hydrolyse par chromatographie sur couche mince (CCM).

1.12.1 Digestion des différents substrats

Une digestion partielle du pustulane (2,5 mg/ml) par la β -1,6-glucanase a été effectuée pendant une heure à 50°C, dans 50 mM de tampon acétate de sodium pH 5,5. A différents temps

d'incubation: 5 min, 20 min et 60 min, 50 µl du mélange réactionnel sur un volume total de 2 ml a été prélevé pour mesurer la quantité de sucres réducteurs produits en utilisant le réactif PAHBAH (0,5%). Le reste de mélange réactionnel a été bouilli pendant 10 min pour dénaturer l'enzyme afin d'analyser par CCM les produits générés lors de l'hydrolyse.

La laminarine (2,5 mg/ml) a été digérée en parallèle avec le pustulane (2,5 mg/ml) dans un volume de 1 ml contenant 10 µl de β -1,6-glucanase (diluée 1/10) et 990 µl de substrat dans du tampon acétate de sodium 10 mM pH5,5, concentration permettant de diminuer l'effet des sels sur la migration en réalisant la chromatographie sur couche mince. L'incubation s'est effectuée à 50°C pendant 17 heures et 500 µl du mélange réactionnel a été dosé selon la méthode de Nelson-Somogyi. Le reste d'hydrolysats a été gardé pour le CCM.

Le dernier substrat utilisé a été le gentiobiose à raison de 1 mg/ml dans le même tampon que précédemment et les temps d'incubation étaient de 24, 48 et 72 heures. Seulement 10 µl de mélange réactionnel a été dosé par la méthode utilisant le réactif PAHBAH 0,5%. Une CCM des hydrolysats a été effectuée.

1.12.2 Chromatographie sur couche mince des produits de digestion

Les produits de digestion du pustulane, de la laminarine et du gentiobiose par la β -1,6-glucanase ont été déposés à raison de 25 à 30 µl sur une plaque de silice (Silica gel-G Whatman) pour la chromatographie. Les standards utilisés étaient le glucose (4 mg/ml) et le gentiobiose (4 mg/ml) dont 5 µl ont été déposés sur la plaque de silice. Le solvant de migration utilisé était composé de n-butanol, d'éthanol et d'eau dans les proportions (5:3:2). Après la migration, la plaque a été séchée puis trempée dans une solution de révélation contenant de l'éthanol, de l'acide sulfurique et de l'anisaldéhyde (9:0,5:0,5) comme décrite par Stahl et Kaltenbach (1961). Une fois sèche, elle a ensuite été chauffée à 90°C jusqu'à apparition des taches (environ 10 min).

CHAPITRE 2

RESULTATS

2.1 Digestion du génome de *Streptomyces* sp. EF-14 et hybridation avec KF-1 et KF-2

L'ADN génomique de *Streptomyces* sp. EF-14 digéré avec différentes enzymes de restriction a été transféré sur membrane de nylon avant d'être hybridé avec chacune des sondes KF-1 et KF-2 (voir Matériel et méthodes). Les deux sondes donnant des résultats d'hybridation très semblables, seuls ceux obtenus avec la sonde KF-1 sont représentés à la figure 1. Pour chaque enzyme de restriction utilisée, le puits équivalent montre plusieurs signaux, dûs à l'hétérogénéité de la sonde qui était composée d'un mélange de 8 séquences nucléotidiques différentes. Parmi les enzymes de restriction utilisées, nous avons retenu *Bgl*III (puits 2, fig. 1) pour la construction de la banque génomique totale de *Streptomyces* sp. EF-14 dans *E. coli* DH10B. En effet, *Bgl*III a donné des signaux avec des fragments d'ADN génomique de taille moyenne d'environ 12,5 Kb. D'autre part, l'enzyme de restriction *Bam*HI a également donné des fragments d'ADN de taille moyenne de 12,5 Kb mais par contre avec beaucoup de signaux au niveau des petits fragments d'ADN de 3 à 4 Kb avec la sonde KF-1 (résultats non montrés). Cette enzyme a été choisie pour construire la banque génomique partielle de *Streptomyces* sp. EF-14 dans *E. coli* XLI-Blue MRF'.

2.2 Construction des banques génomiques *Bam*HI et *Bgl*III de EF-14

La banque génomique partielle de EF-14 a été construite avec le plasmide pUC119. Des fragments d'ADN de *Streptomyces* sp. EF-14 (5 à 20 Kb) extraits du gel d'agarose 0,8% ont été ligués au plasmide pUC119 coupé par *Bam*HI dans un rapport molaire de 3:1 (insert:vecteur). En utilisant le système de détection de colonies bleues versus les colonies blanches, 7000 transformants blancs ont été obtenus avec 6700 recombinants (dont les plasmides portaient un insert) et 300 transformants (avec des plasmides ne portant aucun insert). Pour la banque totale,

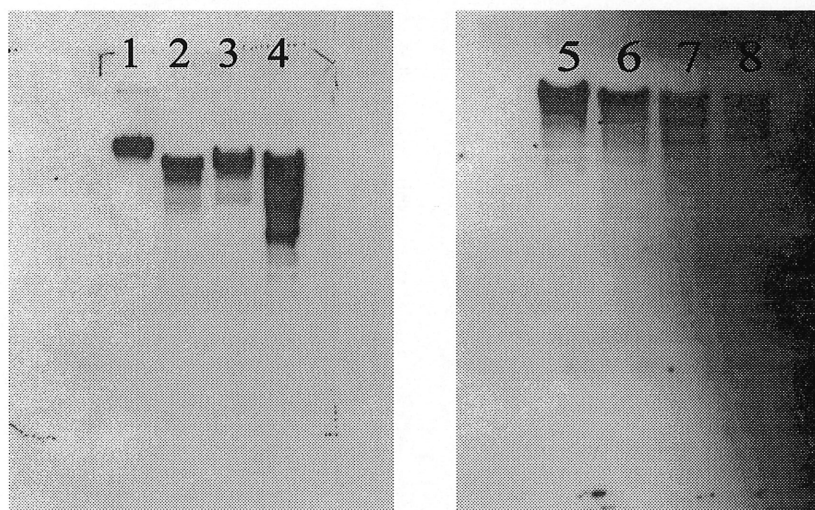


Fig.1. Hybridation de l'ADN génomique de EF-14 digéré par différentes enzymes de restriction avec l'oligonucléotide KF-1 marqué au ^{32}P . Puits1: ADN génomique non digéré; 2: *ScaI*; 3: *BglII*; 4: *NotI*; 5: *PstI*; 6: *PvuII*; 7: *MluI*; 8: *NruII*.

la ligation (dans le rapport 3:1) des fragments d'ADN *Bgl*III de taille moyenne de 12,5 Kb avec le plasmide pFD666 digéré par *Bam*HI a généré 14700 recombinants qui représentaient le génome de *Streptomyces* sp. EF-14 à 99,9% (annexe 1).

2.3 Criblage des clones positifs

2.3.1 Détection phénotypique

La banque génomique partielle dans *E. coli* XLI-Blue a été étalée sur le milieu solide T-PUST (6 g/L de TSB + 10 g/L de pustulane) dans des boîtes de pétri pour tester la capacité des recombinants à dégrader le pustulane. Après une semaine d'incubation à 37°C, aucune colonie n'a produit une zone de dégradation autour d'elle. Les 14700 recombinants de la banque totale ont permis sur le même milieu, la détection de 3 clones préliminaires entourés d'une zone claire visible à l'oeil nu. Après l'extraction de l'ADN plasmidique de ces clones et une analyse plus approfondie, un seul clone s'est avéré être positif: le clone pMH31, dérivé du vecteur pFD666. La colonie de *E. coli* DH10B portant ce plasmide, DH10B(pMH31), a été repiquée sur le milieu minimum M9 solide contenant uniquement du pustulane comme source de carbone (milieu M9-PUST) afin de confirmer l'activité β -1,6-glucanase. La figure 2 montre l'expression du plasmide pMH31 transformé dans *E. coli* DH10B qui était repiquée sur le milieu M9-PUST. La zone claire produite autour de la colonie DH10B(pMH31) sur les pétris 1 et 2 est due à la dégradation du pustulane après 3 jours d'incubation à 30°C. Le témoin, *E. coli* DH10B(pFD666) ne dégradait pas le pustulane.

De plus, *E. coli* DH10B(pMH31) a été striée sur des milieux minimum M9 (Promega) contenant différentes sources de carbone telles que la cellulose (0,4% (p/v)), la laminarine (0,4% (p/v)) et le pustulane (1% (p/v)); le dernier milieu constituant le milieu M9-PUST. Les résultats obtenus sur la dégradation des différents substrats ont été relevés après 3 jours d'incubation des

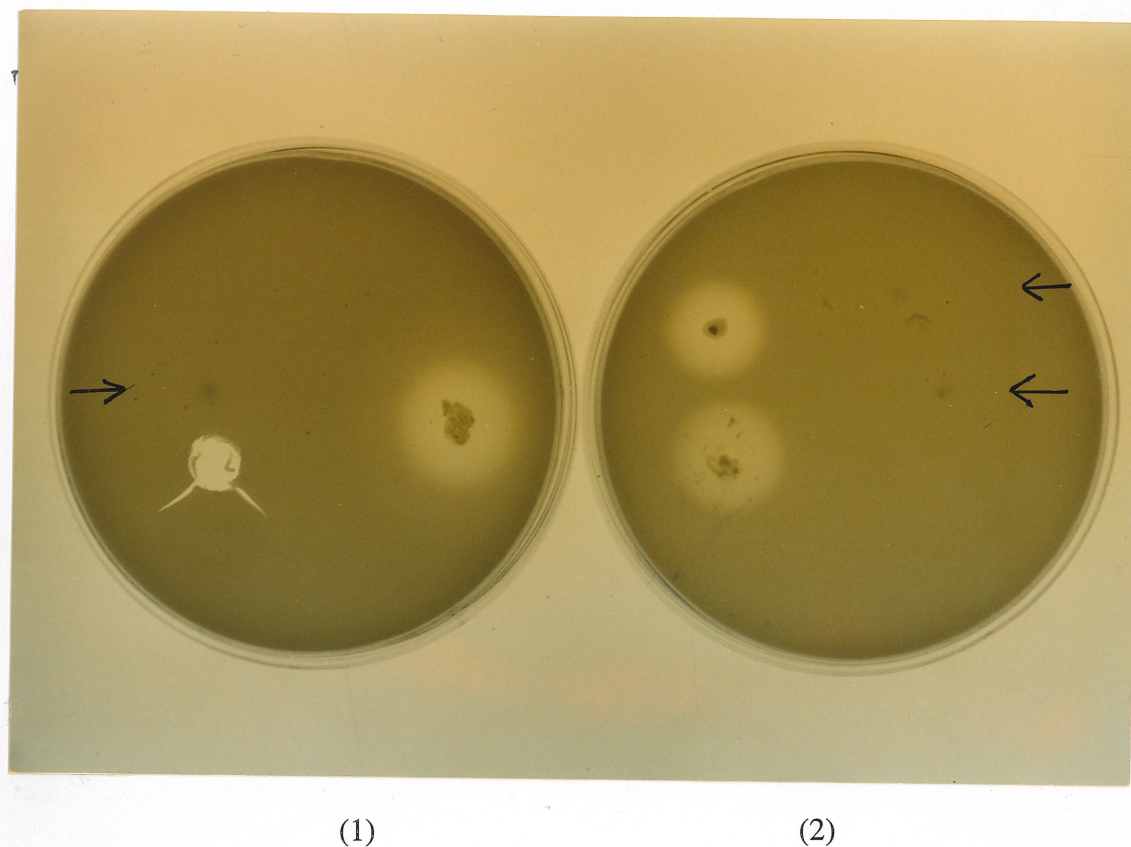


Fig. 2. Expression de la β -1,6-glucanase par *E. coli* DH10B transformée avec le plasmide pMH31. Une zone d'hydrolyse claire indiquant l'activité β -1,6-glucanase est évidente autour de la colonie repiquée sur le milieu minimum M9 contenant du pustulane et de la kanamycine. Les témoins DH10B(pFD666), indiqués par une flèche, ne dégradaient pas le pustulane. A gauche, le pétri (1) contient le milieu M9-PUST opacifié alors qu'à droite, le pétri (2) a été coloré au rouge congo 0,2% .

pétris à 30°C. Le tableau III illustre les différentes activités enzymatiques du clone DH10B(pMH31). La souche DH10B portant le plasmide pFD666 a servi de témoin négatif pour ce test. Nous avons noté l'absence de zone de dégradation autour de ce transformant sur tous les milieux testés. Cependant, DH10B(pMH31) crée autour d'elle une zone de dégradation visible sur les milieux contenant la laminarine et le pustulane, après une coloration au rouge congo 0,2%. Par contre, aucune zone de dégradation n'était observée sur le milieu contenant la cellulose. La conclusion tirée de ces résultats est que le clone DH10B(pMH31) possède à la fois les activités β -1,3- et β -1,6-glucanases mais aucune activité β -1,4-glucanase.

DH10B(pMH31) a été également striée sur deux autres milieux: le milieu minimum M9 contenant 1% de pustulane comme source de carbone mais l'agarose avait été remplacée par de l'agar et un milieu faiblement riche, contenant 0,6% (p/v) de TSB, 1% (p/v) de pustulane et 1,5% (p/v) d'agarose. Sur le premier milieu, il n'y avait qu'une faible dégradation de pustulane comparé au milieu M9-PUST et sur le deuxième milieu il n'y avait pas de dégradation. Sur ces deux milieux, le témoin négatif ne produisait aucune zone de dégradation (tableau III).

2.3.2 Traitement à la coumermycine A₁

Dans l'optique de vérifier que c'est bien le plasmide pMH31 qui était impliqué dans la dégradation du pustulane du milieu M9-PUST mais non pas la souche DH10B elle-même, des traitements de DH10B(pMH31) à la coumermycine A₁ (1 μ g/ml, 2 μ g/ml, 5 μ g/ml et 10 μ g/ml) ont été effectués. Selon Samuels *et al* (1994), la coumermycine A₁ est un antibiotique de la famille des agents antimicrobiens à base de coumarine. Elle interagit avec la sous-unité B de la gyrase, une topoisomérase de type II de l'ADN procaryotique qui introduit un surenroulement négatif de l'ADN, en cassant transitoirement les deux brins d'ADN de l'hélice et en utilisant l'hydrolyse de l'ATP pour passer une portion de la molécule d'ADN à travers la cassure du double brin. Lors d'un traitement à la coumermycine A₁, cette dernière se lie à la gyrase et

Tableau III: Expression des β -glucanases par le clone DH10B(pMH31) sur des milieux solides contenant différentes sources de carbone et 1,5% d'agarose ou d'agar. Le transformant DH10B(pFD666) a servi de témoin négatif et ne dégradait aucun des ces milieux. Le signe (+) signifie qu'il y a une zone de dégradation et le signe (-) témoigne de l'absence de cette zone. Plus il y a de signes (+), plus le diamètre de cette zone est important.

Milieux	DH10B(pMH31)	DH10B(pFD666)
M9-pustulane + agarose	+++++	-
M9-laminarine + agarose	+++	-
M9-cellulose + agarose	-	-
M9-pustulane + agar	++	-
TSB + pustulane + agarose	-	-

inhibe son activité ATPase selon un mécanisme non compétitif. Ce qui stabilise la protéine et diminue fortement son affinité pour l'ATP (Maxwell, 1993). Ainsi, les molécules d'ADN circulaire se trouvent relaxées et les fonctions d'ADN telles la réplication, la transcription et certains types de recombinaison sont affectées. Par ailleurs, selon Contreras et Maxwell (1992) et Del Castillo *et al* (1991), des mutations localisées dans le domaine N-terminal de la gyrase B confère une résistance à la coumermycine A₁. Chez *E. coli*, c'est la mutation du résidu Arg-136 dans le domaine N-terminal de la gyrase qui est responsable de la résistance des souches à la coumermycine A₁. Nos résultats sont en accord avec ces hypothèses puisqu'après environ 18 heures de croissance de la souche DH10B(pMH31) traitée à la coumermycine A₁ (5 µg/ml) à 37°C, une extraction plasmidique effectuée sur cette souche a confirmé la perte du plasmide pMH31. La striation de cette souche dépourvue du plasmide pMH31 sur le milieu M9-PUST ne montrait alors aucune zone de dégradation du pustulane.

2.3.3 Criblage par hybridation avec KF-1

La deuxième méthode de criblage était l'hybridation avec la sonde KF-1 utilisant la technique "SIB selection". Cette technique a été utilisée pour la détection des clones ayant une séquence homologue à la sonde KF-1 (5'-GCSCAGGTSTGGGTSAC-3'). De la banque génomique totale *Bg*III, 24900 recombinants ont été divisés en 20 populations plasmidiques, de A à T suivant l'ordre alphabétique et contenant chacune environ 1250 colonies. La figure 3 reproduit la procédure de sélection qui a été utilisée. Toutes les populations ont été digérées avec l'enzyme *Pst*I pour linéariser le plasmide recombinant ou pour couper l'insert en plusieurs fragments. La figure 4 montre l'hybridation des populations plasmidiques de A à T avec la sonde KF-1. Ce qui a permis la sélection des populations F, H, S et Q montrant des signaux plus prononcés parmi les 20 populations analysées. Les signaux conservés chez toutes les populations au niveau du fragment de 5,25 Kb provenaient de la concentration très élevée du vecteur pFD666. Ces signaux ont été considérés comme un bruit de fond sur l'autoradiogramme. Les

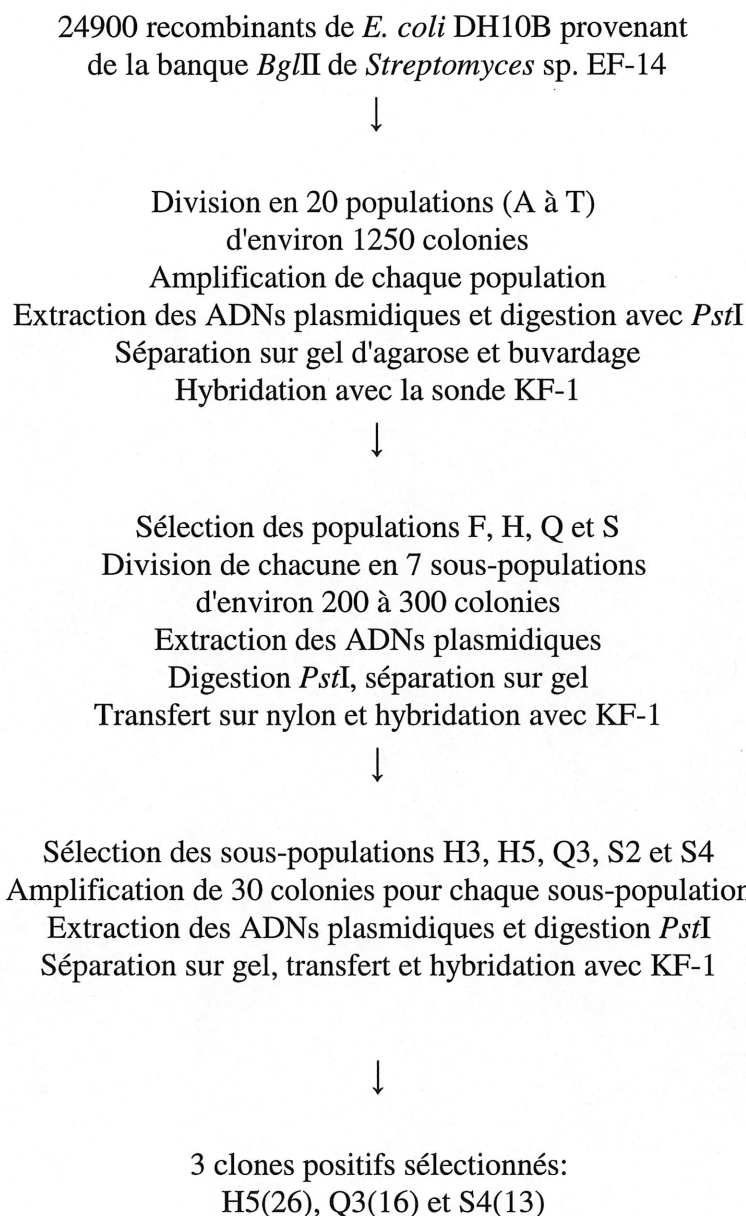


Fig. 3. Stratégie de criblage de la banque totale *Bgl*III de *Streptomyces* sp. EF-14 par hybridation avec la sonde KF-1. La banque contenait 24900 recombinants qui ont été divisés en 20 populations initiales désignées par les lettres de l'alphabet de A à T.

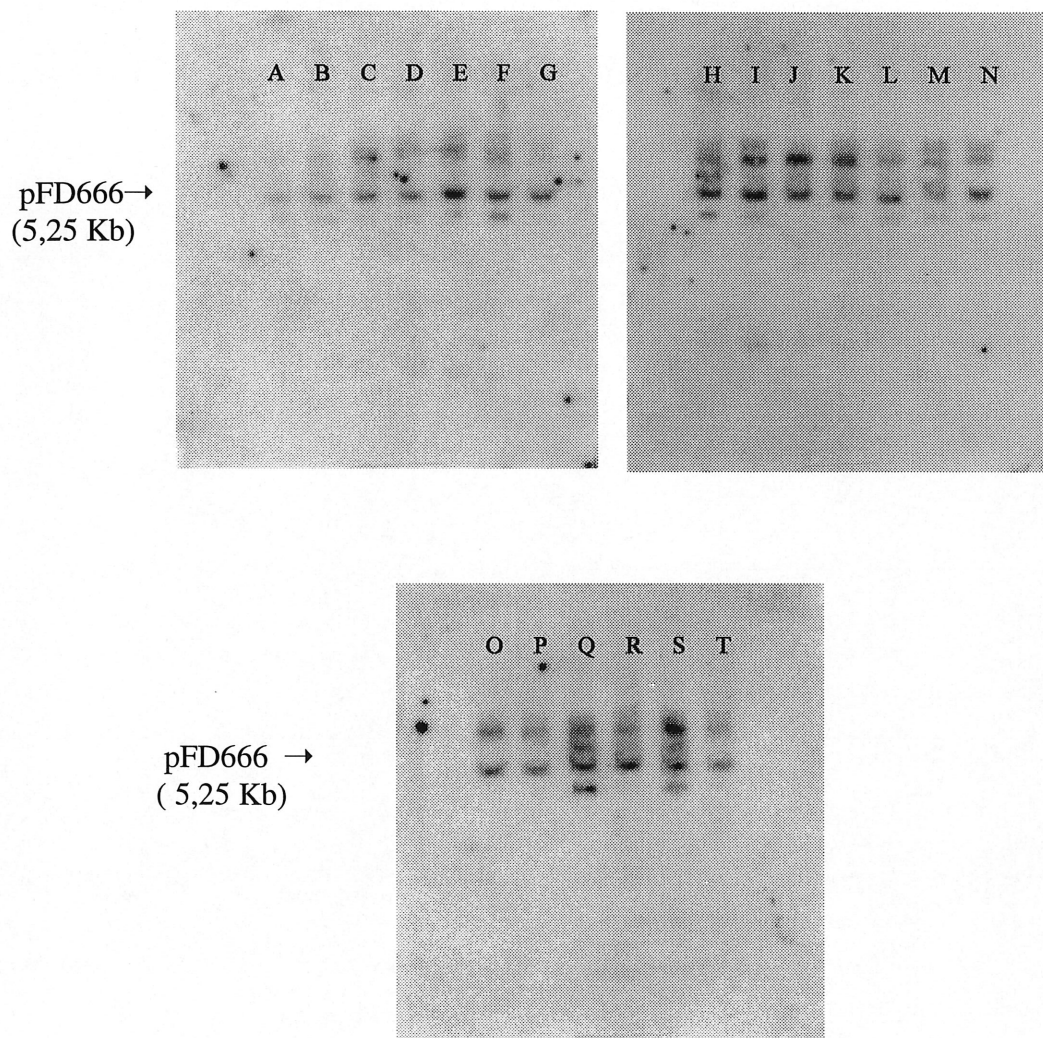


Fig. 4. Hybridation des populations plasmidiques de A à T, provenant de la banque génomique de EF-14, avec la sonde KF-1. L'ADN de chaque population a été extrait à partir d'environ 1245 colonies puis a été digéré par l'enzyme de restriction *Pst*I avant le buvardage. L'analyse de l'autoradiogramme a permis de retenir les populations F, H, Q et S pour les étapes subséquentes.

quatre populations choisies ont été divisées chacune en 7 sous-populations d'environ 200 à 300 colonies puis les étapes ont été suivies comme décrit par la figure 3. La figure 5 montre les résultats d'hybridation des populations plasmidiques F, H, S et Q divisées chacune en 7 sous-populations, avec la sonde KF-1. Cinq sous-populations H3, H5, Q3, S2 et S4 ont donné des signaux avec des patrons différents et ont été retenues pour sélectionner les clones positifs. Finalement, 30 colonies de chaque sous-population ont été analysées individuellement. La figure 6 montre les clones H5(26), Q3(16) et S4(13) qui ont hybridé avec la sonde KF-1. Le clone H5(26) donnait un signal plus fort que Q3(16) et S4(13). La taille de l'insert du clone H5(26) est d'environ 2,75 Kb. Le fragment le plus petit de ce clone donnant un signal avec la sonde KF-1 s'élevait à 0,780 Kb et présentait des extrémités *Xho*I. Les clones S4(13) et Q3(16) ont respectivement un insert d'environ 0,880 Kb et 10,75 Kb qui émettaient un signal avec la sonde KF-1 (fig.6).

2.4 Carte de restriction de pMH31

Le clone pMH31 a une taille d'environ 13,8 Kb avec un insert de 8,55 Kb au site *Bam*HI du vecteur navette pFD666 (5,25 Kb). L'insert possède des extrémités *Bgl*III et aucun site *Bgl*III interne. La carte de restriction du clone est représentée à la figure 7A. Certains sites comme *Sma*I et *Sac*II sont représentés plusieurs fois dans l'insert et les enzymes de restriction telles que *Bam*HI, *Bgl*III et *Pst*I ne coupent pas dans l'insert. Pour localiser la région homologue à la sonde KF-1, le clone pMH31 a été digéré par différentes enzymes de restriction puis les fragments ont été séparés sur gel d'agarose 0,8% (fig. 8A). Après le transfert de l'ADN sur une membrane de nylon et l'hybridation avec la sonde hétérogène KF-1, nous avons remarqué à la figure 8B que pour chaque digestion donnant plusieurs fragments d'ADN, un seul de ceux-ci a donné un signal sauf dans le puits 5 où il y a eu deux signaux différents émis. En conclusion, la région homologue à la sonde KF-1 a été localisée sur un petit fragment d'environ 1,6 Kb, bordé de sites *Sma*I, et localisé lui-même sur le fragment d'ADN de 2,9 Kb aux extrémités *Not*I- *Sca*I (fig. 7B).

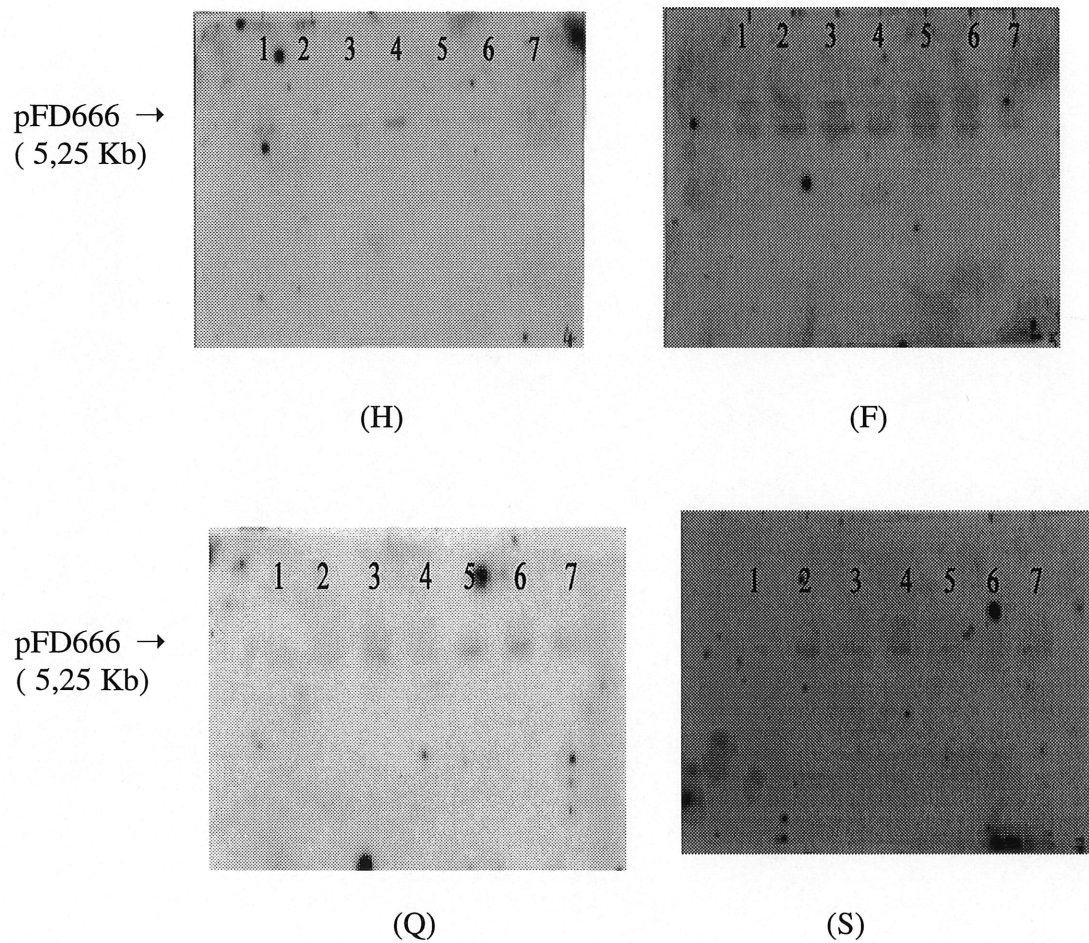


Fig. 5. Hybridation des populations plasmidiques F, H, Q et S, divisées chacune en 7 sous-populations, avec la sonde KF-1. L'ADN extrait à partir de 200 à 300 colonies a été digéré par l'enzyme de restriction *Pst*I avant d'être transféré sur membrane de nylon pour l'hybridation avec la sonde KF-1. H3, H5, Q3, S2 et S4 ont été retenues pour l'étape suivante.

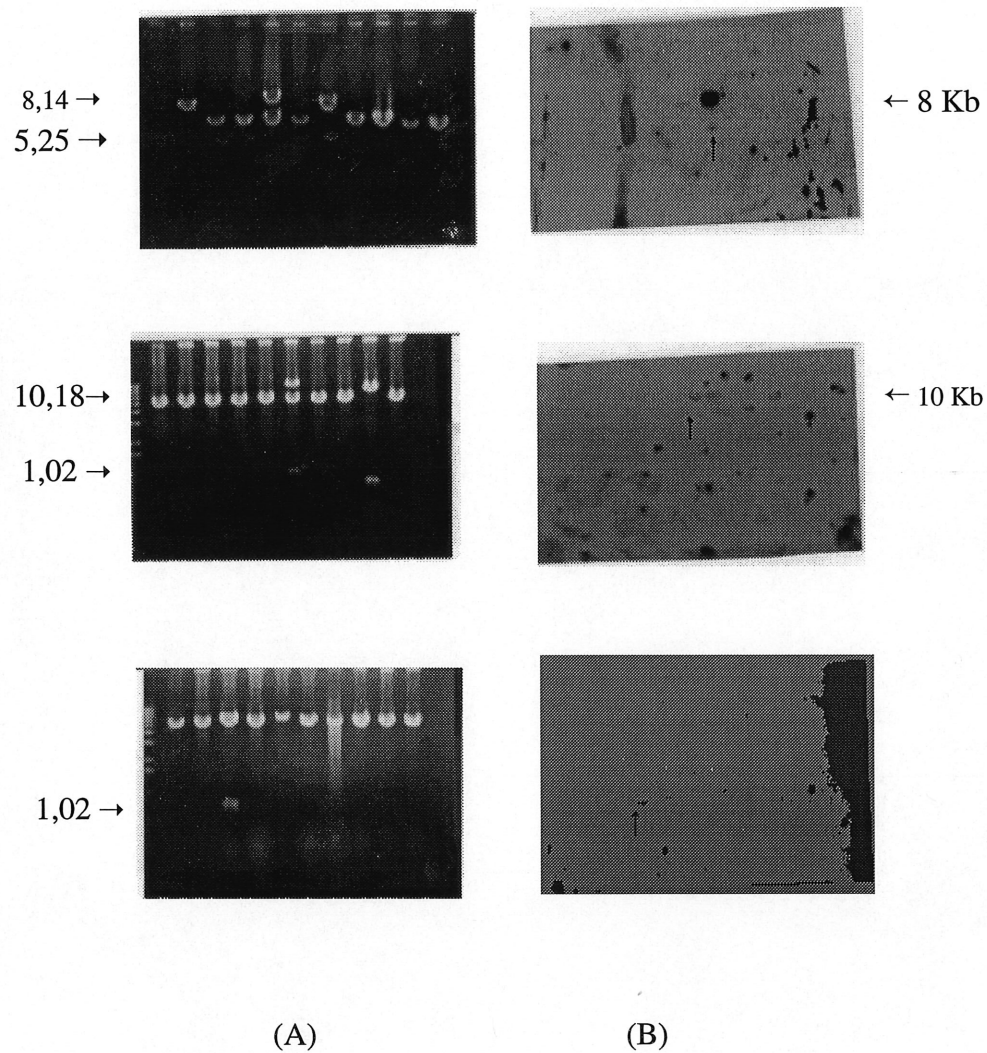
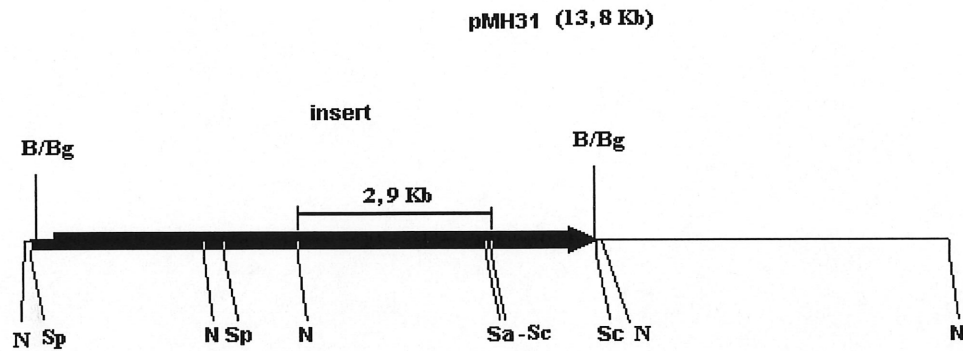


Fig. 6. Analyse des clones H5(26), Q3(16) et S4(13) dont l'ADN provient respectivement des colonies uniques des sous-populations H5, Q3 et S4.

- A: Profil électrophorétique des ADNs plasmidiques digérés par l'enzyme de restriction *Pst*I.
- B: Buvarpage et hybridation avec la sonde KF-1; exposition à un film sensible pendant 48 heures à -70°C.

(A)



(B)

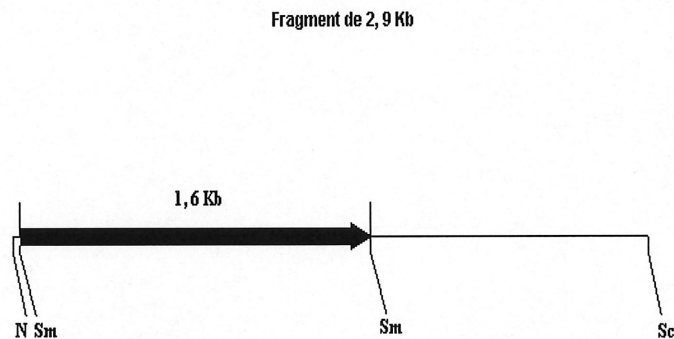


Fig. 7. Carte de restriction du clone pMH31.

A: Le vecteur pFD666 de 5,25 Kb (trait fin) et l'insert de 8,5 Kb (trait épais) sont représentés avec différents sites de restriction.

B: Carte partielle du fragment *NotI-ScaI* de 2,9 Kb de pMH31, le fragment *SmaI* de 1,6 Kb en trait épais correspond à la région homologue à la sonde KF-1.

B: *Bam*HI; Bg: *Bgl*II; N: *Not*I; Sa: *Sac*II; Sc: *Sca*I; Sm: *Sma*I; Sp: *Sph*I.

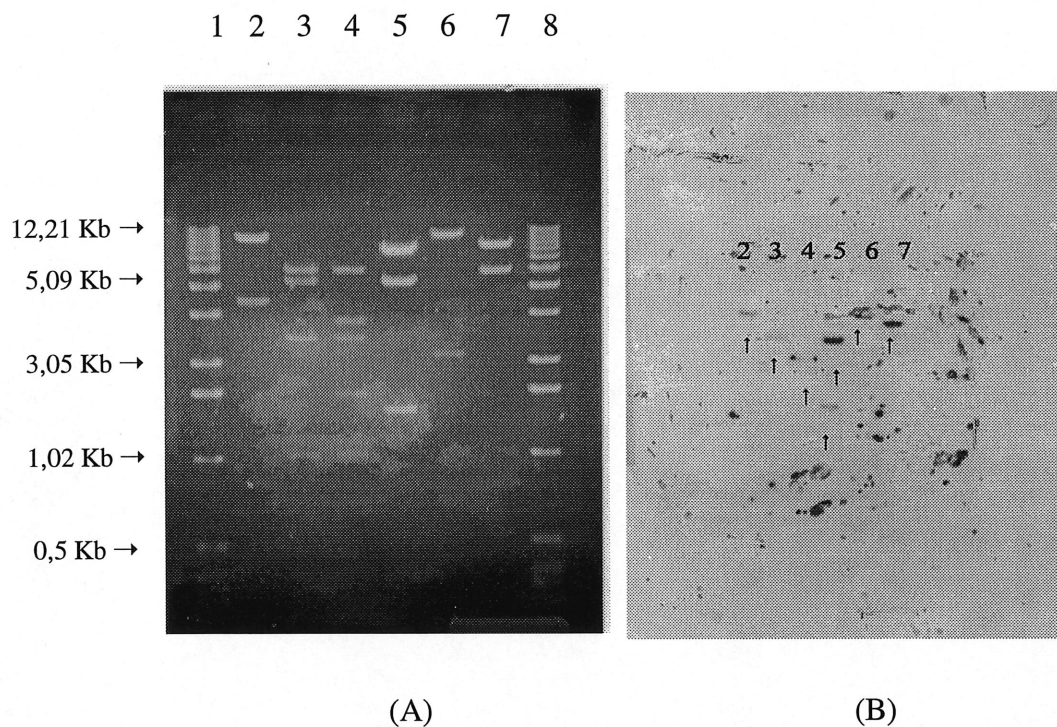


Fig. 8. Identification du fragment d'ADN du clone pMH31, homologue à la sonde KF-1.

- A: Profil électrophorétique du clone pMH31 digéré par différentes enzymes de restriction. Puits 1 et 8: marqueur du poids moléculaire, 1 Kb ladder; 2: *Sph*I; 3: *Sph*I+*Not*I; 4: *Sph*I+*Not*I+*Sca*I; 5: *Not*I; 6: *Nco*I; 7: *Asn*I.
- B: Hybridation à la Southern des fragments d'ADN du clone pMH31 résultant de différentes digestions enzymatiques. La sonde KF-1 utilisée a été marquée au ^{32}P et l'exposition au film sensible s'est effectuée à -70°C pendant 24 heures. Les signaux sur l'autoradiogramme sont indiqués par des flèches.

2.5 Séquençage des fragments d'ADN homologues à la sonde KF-1

Les fragments d'ADN homologues à la sonde KF-1 provenant des clones H5(26) et S4(13) sélectionnés par "SIB selection" ainsi que les fragments *Sac* II-*Not* I de 1,7 Kb et *Sma* I-*Sma* I de 1,6 Kb provenant du clone pMH31 (fig. 7) ont été sous-clonés dans les plasmides pBluescript SKII⁺ et SKII⁻ pour la production des brins d'ADN complémentaires de chaque fragment. Ceci avait pour but de faciliter le séquençage des fragments d'ADN sur chacun des brins opposés, en utilisant l'amorce universelle pour le brin produit avec le plasmide SKII⁺ et l'amorce inverse pour le brin produit avec le plasmide SKII⁻, afin de retrouver la séquence nucléotidique qui hybridait avec l'oligonucléotide KF-1

La figure 9 montre une partie de la séquence nucléotidique du fragment de 0,780 Kb du clone H5(26). Sur ce fragment, 658 nucléotides ont été séquencés et la région d'homologie avec la sonde KF-1 a été localisée. Les 13 bases soulignées (5'...GTGGGTGTGGACG...3') sont celles qui hybridaient avec l'oligonucléotide KF-1 (5'-GCSCAGGTSTGGGTSAC-3'), le S dans la séquence remplaçant un nucléotide G ou C (fig. 9). A l'aide du programme FRAME exploité couramment pour identifier les séquences codantes des gènes chez les streptomycètes (Bibb *et al*, 1984), une phase de lecture ouverte (ORF) incomplète de 208 acides aminés (cadran de lecture -3) a été localisée (fig. 10). Sur cette figure, nous avons localisé une erreur de séquençage, dans la région allant de la base 460 à la base 560. Cette erreur est survenue lors de la détermination de la séquence d'ADN ce qui a causé un changement de cadre de lecture et par conséquent un patron irrégulier des trois courbes de pourcentage en G+C aux différentes positions du codon. Ainsi, la séquence nucléotidique de H5(26) à la figure 9 a été analysée directement sur le séquenceur automatique. En suivant l'ordre des bases représenté par une succession de pics d'émission de couleur équivalent à chacune des bases A, C, G et T détectées par un photomultiplicateur, nous avons noté qu'il y a eu un ajout de G (en gras) à la position 346 suivi d'une omission de G entre les bases 438 et 439 (fig. 9). Après avoir corrigé ces erreurs, une

5' ---XhoI

```

1  CTCGAGGGCCCCCTGCAGGTCGCGACTCTAGAGGATCTCCTCGATGCGCGCGGCGAGGGCG
61  TCACCGCCCGCCGAGACCCGGTACAGGCCGGAGAGGGTCGCGGCCTTGAAGCCGGGCATG
121 TCGCCGTCGGCGTTGATGTGGATGAGCTTGGCCAGCTCGTCGTTGTCGATCACCGGGAAG
181 GGCAGGGTGACCGAGCGGCAGGAGGCGGCCGTCGGCTCCAGCAGGTTGCCCTCCGGGCCC
241 AGCGACGAGCGCAGGGAGGTGACCAGTTCCTCGCGGATGGCGTCCAGCGGCGGGTTGGTG
301 ACCTGCGCGAAGAGCTGGGTGAAGTAGTCGAAGAGCAGCCGGGGGGCGCTCGGAGAGGGC
361 CGCGATCGGGGAGTCCGTGCCCATGGAGCCGATCGGCTCGGCGCCGGCGCGGGCCATCGG
421 CGCGAGGATGACGCGCACTCTTCCTCGGTGTAGCCGAAGGTCTGCTGGCGGCGGGTGACC
481 GAGGCGTGGGTGTGGACGATGTGCTCGCGCTCGGGCAGGTTCGACCAGCTCGATCTCGCCG
541 GCCTCCAGCCATTTCGGCGTACGGCTTCTCGGCGGCGAGGGACGCCTTGAGCTCGTCGTCC
601 TCGATGATGCGGTGCTCGGCGGTGTGACGAGGAACATCCGGCCGGGCTGGAGACGGG-3'

```

Fig. 9. Séquence nucléotidique du fragment de 0,780 kb du clone H5(26). Les nucléotides soulignés sont ceux qui hybridait avec la sonde KF-1 et ceux en gras sont les nucléotides ajoutés (position 346) ou omis (entre les positions 438 et 439) lors de la lecture de séquence par le séquenceur. La séquence nucléotidique est numérotée à partir de l'extrémité 5' au site *XhoI* du fragment cloné dans le plasmide pBluescript SKII⁺.

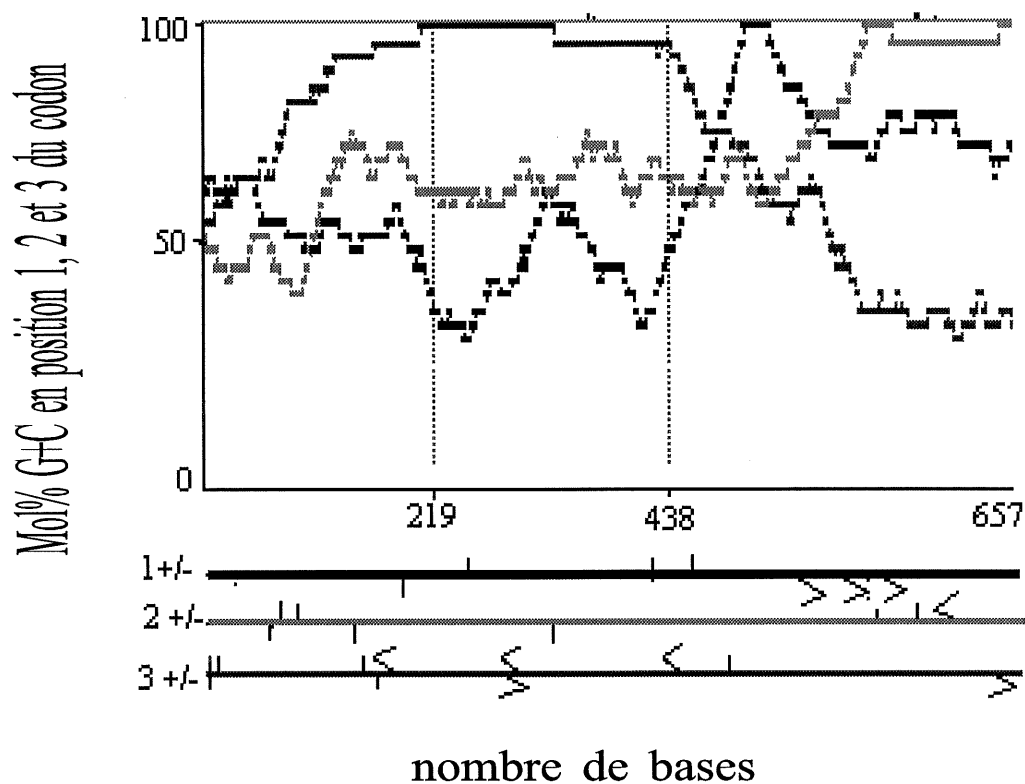


Fig. 10. Analyse informatique de la séquence nucléotidique du fragment *XhoI-XhoI* de 0,780 Kb du clone H5(26) à l'aide du programme FRAME. Le pourcentage de guanine et de cytosine retrouvé aux différentes positions (1, 2 et 3) de chaque codon est indiqué en ordonnée et le nombre de bases en abscisse. Les cadres de lecture (1+/-), (2+/-) et (3+/-) en abscisse sont associés au pourcentage en G+C aux positions équivalentes. Les têtes de flèche (<) indiquent le codon d'initiation de traduction et son orientation de gauche à droite et (>) de droite à gauche. Les barres verticales indiquent le codon stop.

séquence nucléotidique hypothétique a été établie puis analysée (fig.11). La comparaison de la séquence en acides aminés (ORF208) déduite de cette séquence nucléotidique avec celles des bases de données Swissprot et GenBank a révélé une homologie significative de l'ORF 208 avec la glutamate synthase ferredoxine-dépendante de *Mycobacterium tuberculosis* (Cole *et al*, 1998), de *Synechocystis* sp. PCC6803 (Navarro *et al*, 1995) et *Bacillus subtilis* (Bohannon et Sonenshein, 1989). Le pourcentage d'identité entre les séquences en acides aminés de l'ORF 208 du clone H5(26) et la glutamate synthase ferredoxine-dépendante était de 57% sur 208 a.a. pour *M. tuberculosis*, de 48% sur 208 a.a. pour *Cynechocystis* sp. PCC6803 et 47% sur 171 a.a. pour *B. subtilis*. Un alignement de séquence en acides aminés de l'ORF 208 et de la glutamate synthase ferredoxine-dépendante de *M. tuberculosis* est illustré à la figure 12.

La séquence nucléotidique et en acides aminés du fragment d'ADN de 0,880 Kb du clone S4(13) homologue à la sonde KF-1 est représentée à la figure 13. Elle débute au site de restriction *NotI* et se termine avec le site *XbaI*. Dans cette séquence, à deux endroits différents, 7 bases (soulignées dans la séquence nucléotidique) hybridait avec l'oligonucléotide KF-1 (fig. 13). Ce qui aurait produit le faible signal sur l'autoradiogramme (fig.6B). L'analyse de cette séquence nucléotidique à l'aide du programme FRAME (résultat non montré) a permis de localiser une phase de lecture ouverte incomplète de 176 acides aminés dans le cadran de lecture +1. En comparant cette séquence en acides aminés avec celles des bases de données Swissprot, nous avons trouvé que l'ORF 176 avait une forte homologie avec l'histidine kinase provenant de plusieurs organismes parmi lesquels nous citons *Borrelia burgdorferi* (Old *et al*, 1997) avec un pourcentage d'identité de 39% sur 61 a.a., 41% sur 55 a.a. avec celle de *Pseudomonas putida* (Ditty *et al*, 1998) et 35% sur 68 a.a. avec celle de *Rhizobium etli* (Tawari *et al*, 1996). Un alignement de séquence en a.a. de l'ORF 176 et celle de l'histidine kinase de *R. meliloti* est représenté à la figure 14.

La digestion du clone pMH31 avec plusieurs enzymes de restriction et l'hybridation des


```

3  CGTCTCCAGCCCCGGCCGGATGTTCTCGTCGACACCGCCGAGCACCGCATCATCGAGGAC
   R L Q P G R M F L V D T A E H R I I E D
63  GACGAGCTCAAGGCGTCCCTCGCCGCCGAGAAGCCGTACGCCGAATGGCTGGAGGCCGGC
   D E L K A S L A A E K P Y A E W L E A G
123 GAGATCGAGCTGGTCGACCTGCCCCGAGCGCGAGCACATCGTCCACACCCACGCCTCGGTC
   E I E L V D L P E R E H I V H T H A S V
183 ACCCGCCGCCAGCAGACCTTCGGCTACACCGAGGAAGACGTGCGCGTCATCCTCGCGCCG
   T R R Q Q T F G Y T E E D V R V I L A P
243 ATGGCCCGCGCCGGCGCCGAGCCGATCGGCTCCATGGGCACGGACTCCCCGATCGCGGCC
   M A R A G A E P I G S M G T D S P I A A
303 CTCTCCGAGCGCCCCCGGCTGCTCTTCGACTACTTCACCCAGCTCTTCGCGCAGGTCACC
   L S E R P R L L F D Y F T Q L F A Q V T
363 AACCCGCCGCTGGACGCCATCCGCGAGGAAGTGGTCACCTCCCTGCGCTCGTCGCTGGGC
   N P P L D A I R E E L V T S L R S S L G
423 CCGGAGGGCAACCTGCTGGAGCCGACGGCCGCCTCCTGCCGCTCGGTACCCCTGCCCTTC
   P E G N L L E P T A A S C R S V T L P F
483 CCGGTGATCGACAACGACGAGCTGGCCAAGCTCATCCACATCAACGCCGACGGCGACATG
   P V I D N D E L A K L I H I N A D G D M
543 CCCGGCTTCAAGGCCGCGACCCTCTCCGGCCTGTACCGGGTCTCCGGCGGGCGGTGACGCC
   P G F K A A T L S G L Y R V S G G G D A
603 CTCGCCGCGCGCATCGAGGAGATCCTCTAGAGTCGCGACCTGCAGGGGCCCTCGAG
   L A A R I E E I L *

```

Fig. 11. Séquence nucléotidique hypothétique (658 bases) et en acides aminés (cadran de lecture-3) du fragment de 0,780 Kb du clone H5(26). Cette séquence (complémentaire inverse de celle représentée à la fig. 9) est numérotée à partir de l'extrémité 5' au troisième nucléotide et finit par un site *Xho*I à l'extrémité 3'. L'astérisque représente un codon stop.

```

1      RLQPGRMFLVDTAEHRIIEDDELKASLAAEKPYAEWLEAGEIELVDLPEREHIVHTHASV 60
      RLQPGRMFLVDTA+ RI+ D+E+KA LAAE PY EWL+ G + L +LPE + +   H   +
29864 RLQPGRMFLVDTAQGRIVSDEEIKADLAAEHYPYQEWLDNGLVPLDELPEGKDVRMPHHRI 29685

61     TRRQQTFGYTEEDVRVILAPMARAGAEPIGSMGTDSPIAALSERPRLLFDYFTQLFAQVT 120
      RQ  FGYT E++ +++APMAR GAEPIGSMGTD+P+A LS+RPR+L+DYF QLFAQVT
29684 VMRQLAFGYTYEELNLLVAPMARLGAEPIGSMGTDTPVAVLSQRPRMLYDYFHQLFAQVT 29505

121    NPPLDAIREELVTSLRSSLGPEGNLLLEPTAASCRSVTLPPFPVIDNDELAKLIHIN----A 176
      NPPLDAIREE+VTSL+ + G E +LL P   SC  + LP P++ N ELAKL+ ++
29504 NPPLDAIREEVVTSLQGTGGGERDLLNPDQNSCHQIVLPQPILRNHELAKLVSLDPNDKV 29325

177    DGDMPGFKAATLSGLYRVSGGGDALAARIEEI 208
      +G  G ++  +  LYRVS GG  LAA +EE+
29324 NGRPHGLRSKVIRCLYRVSEGGAGLAAALEEV 29229

```

Fig. 12. Analyse comparative de la séquence en acides aminés de l'ORF 208 (séquence du haut), du 1^{er} a.a. au 208^e a.a., avec celle de la glutamate synthase ferredoxine-dépendante de *Mycobacterium tuberculosis* (séquence du bas) entre les nucléotides 29229 et 29864. La séquence du milieu indique les acides aminés identiques aux deux séquences comparées, le signe + indiquant les acides aminés similaires et les espaces vides les acides aminés différents.

5'---NotI

1 GGCCGCAGTACTGGATCTCCCCGCACTTCCTCTACAACTCGCTCGCGGCGATCGCGTCCT
 G R S T G S P R T S S T T R S R R S R P

61 TCGTCCGCACCGACCCCGAGCGGGCCCGGGACCTGCTGCTGGAGTTTCGCCGACTTCGCCC
 S S A P T P S G P G T C C W S S P T S P

121 GCTACTCGTTCCGCCGGCACGGAGGTTTACCACCCTGGCCGAGGAGCTGCGTCCATCGAG
 A T R S A G T E V H H P G R G A A S I E

181 CAGTTCTCTGGAGCTGGTCCGCGCCCGGTTTCGGGCCGCGCCTGGAGGTGACCTTGCGGATC
 Q F L E L V R A R F G P R L E V T L R I

241 GCCCCGGAGGTGCTGCCCCGTGGCGGTGCCCTTCCTGTGCCTGCAGCCGCTGGTGGAGAAC
 A P E V L P V A V P F L C L Q P L V E N

301 GCGGTCAAGCACGGCCTCGGGGACGGCGGCGAGCGCGGCCGATCAGCCTCACCGCGCGG
 A V K H G L G D G G E R G R I S L T A R

361 GACGAGGGGGCGACGGCACGGATCGTCGTGGAGGACGACGGCGTCGGCATGGAGCCGGAC
 D E G A T A R I V V E D D G V G M E P D

421 CGGCTGCGGCGCATCCTGCGCGGCGGCGAGGATGCCGCCGCCGGCATCGGGCTGCGCAAC
 R L R R I L R G G E D A A A G I G L R N

481 GTGGACGAGCGGCTGCGCCAAGGTCTACGGCGACGACCACGGGCCTGGTGATAGAGACCG
 V D E R L R Q G L R R R P R A W *

541 GCCGTGGGAGCCGGCATGAAGATCACCTGCGCGTCCCCAAGTACCGGCCCCGAGTGCGC

601 GACGGGGCCCCCGGGGCCCGGCACGCCGGACCGGCCGGACGCCGGCCGGTCAGACCGCCC

661 CGCTCGCTGACGGCCGCTGCCGCTGCCGCCGGGCCGCCATCACCGGGTAGACGATGATCC

721 CGACGAACAGGAACAGCACGCCCTGGTACACCGCCGCGTAGCCGGCGCCCGCCATCAGCC

781 AGACGGAGAAGGCGGCGGCCACCGCGGTGACCACGGAGTCCCGCACCAAGCCGCCCCCGGT

841 CCACCGCCCCGGGCCGGCCGCCACCAAGGTGGAAGATCCT-----3'
XbaI

Fig. 13. Séquence nucléotidique du fragment de 0,880 Kb du clone S4(13) et séquence en acides aminés déduite (cadran de lecture +1). Les nucléotides sont numérotés à partir de l'extrémité 5' au site *NotI*. La séquence finit au site *XbaI* en 3'. Les bases soulignées sont celles qui hybridait avec l'oligonucléotide KF-1. L'astérisque représente un codon stop.

```

97  LVENAVKHGLGDGGERGRISLTARDEGATARIIVVEDDGVGMEPDRLRRI-----LRGGE 150
    L+ENAV +          R +++++T          R+ +EDDG G  PD L RI          R +
327 LLENAVDYA-----RKKVTVTTEHTPERVRVTIEDDGEGFSPDILARIGEPYVTRRQKD 380

151 DAAAGIGL 158
    D+A G+GL
381 DSAGGLGL 388

```

Fig. 14. Analyse comparative de la séquence en acides aminés de l'ORF 176 (séquence du haut) du 97^e a.a. au 158^e a.a. et celle de l'histidine kinase de *R. etli* (séquence du bas). La séquence du milieu indique les acides aminés identiques aux deux séquences comparées, le signe + indique les acides aminés similaires et les espaces vides les acides aminés différents.

différents fragments d'ADN avec la sonde KF-1 avaient permis de localiser la région homologe à cette sonde sur un fragment *Not I-ScaI* de 2,9 Kb plus précisément sur le fragment *SmaI-SmaI* de 1,6 Kb (fig. 7B). Ce fragment de 1,6 Kb ainsi qu'un fragment *Not I-SacII* de 1,7 Kb, ne donnant pas de signal avec la sonde KF-1 mais situé en aval du fragment de 2,9 Kb, ont été sous-clonés et séquencés. en totalité pour permettre si possible de déterminer l'orientation du gène de la β -1,6-glucanase sur l'insert d'ADN de 2,9 Kb du clone pMH31 (fig. 7A).

La figure 15 illustre la séquence complète de nucléotides du fragment *NotI-SacII* de 1,7 Kb. A l'aide du programme FRAME deux ORFs (cadran de lecture -2) de 286 et 198 acides aminés, orientées dans le même sens, ont été localisées (résultat non montré). Plusieurs erreurs de lecture étaient notées sur le graphique produit par ce programme. Ce qui a occasionné un changement de cadre de lecture dans les ORFs. Ainsi, la séquence nucléotidique du fragment *NotI-SacII* de 1,7 Kb présentée à la figure 15 a directement été analysée à la source même, sur le séquenceur automatique. En suivant l'ordre des bases représentées par une succession de pics d'émission de couleur détectés par le photomultiplicateur, nous avons noté plusieurs insertions et délétions de bases dans la séquence d'ADN. A la figure 15, un nucléotide C a été omis entre les positions 364 et 365 (nucléotides en gras) puis entre les positions 1110 et 1111. Un T (en gras) a été inséré à la position 1106, un G (en gras) a été inséré à la position 1069 et un autre G a été omis entre les positions 1107 et 1108 (en gras). En insérant les bases omises et en retirant les bases insérées, cette séquence nucléotide de 1687 pb a été corrigée et une séquence hypothétique (1688 pb) a été ainsi établie (fig. 16) puis les séquences en acides aminés des deux ORFs localisées ont été analysées.

L'ORF 286 débute au nucléotide 146 avec un codon d'initiation GTG pour se terminer au nucléotide 1004 avec un codon de terminaison TGA. Nous avons identifié un site d'attachement de ribosome (RBS) possible (GGAG) entre les nucléotides 133 et 136 en amont du codon d'initiation GTG. Cependant, le promoteur et le terminateur de transcription n'ont pas

5'----NotI

```
1  GGCCGCAGTACTGGATCTTCGCGATCAGGGTGCCGCCGGCGATCGGGGTGTTCTGGTGCG
61  GCTTGAGCACCACGGCGTTGCCGAGCGCAAGGGCCGGGGCGACCGACTTCAGCGACAGCA
121 GGAAGGGGAAGTTGAAGGGGCTGATCACGCCGACGACGCCGACCGGCATCCGGTAGACGC
181 GGTTCTCCTTGCCGTCGACGGGCGACGGCAGGATCCTGCCCTCGGGGCGCAGCGCGAGGT
241 GGACCGCCTCGCGCAGGAACCTCCTTGCGAGGTGCAGCTCGAAGCCGGCCTTCACCCGGG
301 TGCCGCCCAGCTCCGCGACGATCAGCTCGGCTATCTCCTGCTCGCGGTCTCGATCAGGC
361 GCAGGCCCGCTCGAAGACACCGCGCCGGGTGTACGGGCTGGTCTCGGCCACTCCTTCTG
421 GGCGCGGGCGGCGGCCTGGTAGGCCTGGTCCACCTCGTCGACCGTGGCCACCGTGATCGA
481 GGCCAGCTTCTCGTCGTTGTACGGATCGAAGTCGATGACGTCCCAGGAGCCCGAGCCCGG
541 GCGCCACTCGCCGTCGATGTACTGCCGGGCCAGGTCCGGTGAAGTAGGACGACATGTGATC
601 CCTCAATCGCTAGCGGCCACAGATCCACGCCAGGTCTGATCGAGCGTCATCCTACTTGCG
661 AGTCACCTGAGTTGGGGCGGATCAGGACAGTTGCAGCAGACCGCGCAGGAGGTGCGGGCT
721 CTCGTCCGGGCCGGGGCTGTCCTGCTGGAGTTCCTTCAGGGCCTGCTCGTACTGGGCGAC
781 GTCCTCGCGTTTGTCCAGGTAGAGAGCGCTGGTCAGCTGCTCCAGGTAGACCACGTCGGA
```

Fig. 15. Séquence nucléotidique du fragment *Not I*-*SacII* de 1687 pb (1,7 Kb) provenant du clone pMH31. La séquence commence avec le nucléotide 1 au site *Not I* en 5' et finit avec le site *Sac II* en 3'. Les nucléotides en gras représentent ceux entre lesquels une base a été omise (positions 364 et 365, 1107 et 1108, 1110 et 1111) ou encore une base rajoutée (positions 1069, 1106) par erreur lors de la lecture de séquence par le séquenceur.

841 CAGGTCGGACTCGGGGAAGCTGAGGATTGTGAAGGCGCCGCTCTCGCCGGAGTGCCCGCC
 901 GAGGCTGAACGGCATGACCTGGAGCCGTACCTTGGGCCGCTCGGAGAGGTCGATCAGGTG
 961 CTGGAGCTGGCCGCGCATCACCTCGCGGTCGCCGTAGGGCCGGCGCAGGGCGGCCTCGTC
 1021 CAGGACGATGTGGAAC TCCGGCGCGTTCGCCGAGAGCAGGTACTTCTG**G**CCGCTCCAGGC
 1081 GCAGGGCGACCCGGCGTTCGACGTCT**TGCGAG**CTCGCGCCCTTCATGCCGCGCCGGACCAC
 1141 CGCGCGGGCATACTCCTCGGTCTGGAGCAGCCCGTGACGAAC TGCACCTCGTAGGCGCG
 1201 GATCAGCGAGGCGGCGCCCTCCAGGCCACGTAGGTCGGGAACCAGCTAGGCAGGACGTC
 1261 GGTGTAAC TGTGCCACCAGCCCGCAACGTTGGCCTCACGGGCGAGGGAGAGCAGCGACTC
 1321 GCGCTCCGCCTCGTCGGTGATGCCGTAGAGCGTCAGCAGGTCCTCCACGTCCCTGGTCTT
 1381 GAAGCTCACCCGGCCCAGTTCATCCGGCTGATCTTCGACTCCGAGGCGCGGATCGAGTA
 1441 GCCCGCCGCCTCGCGCGTGATCCCCCTGGCCTCACGCAGCCGCCTGAGTTGCGAACCAGAG
 1501 CAGCATCCGCCGCACCACCGATCCGGGCTCTCCCGCGCTCACTTCGCCAGCCTCCCCAAC
 1561 CGTCCTCAAGGGCCGAAGTCTGCCACTAAACACTCCGAGCAGTACTCGCATGGTTACGG
 1621 AAACGAAAGCCTCGGCCGTTTCGGGCGGCCCGGACCGGGCACAGGTCGGGACCTCTGGC
 1681 GGCGACC----3'

SacII

Fig. 15 (suite) Séquence nucléotidique du fragment *Not* I-*Sac*II de 1687 pb (1,7 Kb) provenant du clone pMH31.

2 GTCGCCGCCAGAGGTCCCGACCTGTGCCCCGGTCCGGGGCCGCCCGAAACGGCCGAGGCTTT 61
 V A A R G P D L C P V R A A R N G R G F
 62 CCGTTTCCGTAACCATGCGAGTACTGCTCGGAGTGTTTTAGTGGCAGACTTCGGCCCTTG 121
 P F P * P C E Y C S E C F S G R L R P L
 →→→
 122 AGGACGGTTGGGGAGGCTGGCGAAGTGAGCGCGGGAGAGCCCGGATCGGTGGTGC GGCGG 181
 R T V G E A G E V S A G E P G S V V R R
 182 ATGCTGCTCGGTTTCGCAACTCAGGCGGCTGCGTGAGGCCAGGGGGATCACGCGCGAGGCG 241
 M L L G S Q L R R L R E A R G I T R E A
 242 GCGGGCTACTCGATCCGCGCCTCGGAGTCGAAGATCAGCCGGATGGAAC TGGGCCGGGTG 301
 A G Y S I R A S E S K I S R M E L G R V
 302 AGCTTCAAGACCAGGGACGTGGAGGACCTGCTGACGCTCTACGGCATCACCGACGAGGCG 361
 S F K T R D V E D L L T L Y G I T D E A
 362 GAGCGCGAGTCGCTGCTCTCCCTCGCCCGTGAGGCCAACGTTGCGGGCTGGTGGCACAGT 421
 E R E S L L S L A R E A N V A G W W H S
 422 TACACCGACGTCTGCCTAGCTGGTTCCCGACCTACGTGGGCCTGGAGGGCGCCGCTCG 481
 Y T D V L P S W F P T Y V G L E G A A S
 482 CTGATCCGCGCCTACGAGGTGCAGTTTCGTGCACGGGCTGCTCCAGACCGAGGAGTATGCC 541
 L I R A Y E V Q F V H G L L Q T E E Y A
 542 CGCGCGGTGGTCCGGCGCGGCATGAAGGGCGCGAGCGTCGCCGACGTGGAACGCCGGGTC 601
 R A V V R R G M K G A S V A D V E R R V
 602 GCCCTGCGCCTGGAGCGGCAGAAGTACCTGCTCTCGGCGAACGCGCCGGAGTTCCACATC 661
 A L R L E R Q K Y L L S A N A P E F H I
 662 GTCCTGGACGAGGCCGCCCTGCGCCGGCCCTACGGCGACCGCGAGGTGATGCGCGGCCAG 721
 V L D E A A L R R P Y G D R E V M R G Q
 722 CTCCAGCACCTGATCGACCTCTCCGAGCGGCCCAAGGTACGGCTCCAGGTCATGCCGTTTC 781
 L Q H L I D L S E R P K V R L Q V M P F
 782 AGCCTCGGCGGGCACTCCGGCGAGAGCGGCGCCTTCACAATCCTCAGCTTCCCCGAGTCC 841
 S L G G H S G E S G A F T I L S F P E S
 842 GACCTGTCCGACGTGGTCTACCTGGAGCAGCTGACCAGCGCTCTCTACCTGGACAAACGC 901
 D L S D V V Y L E Q L T S A L Y L D K R

Fig. 16. Séquence nucléotidique et en acides aminés du fragment *Not* I-*Sac*II de 1688 pb (1,7 Kb) provenant du clone pMH31. La séquence commence avec le 2^e nucléotide au site *Sac*II en 5' et finit avec le site *Not*I en 3'. Les nucléotides en gras représentent les points où il y a eu une erreur de lecture au cours du séquençage. Les sites putatifs d'attachement des ribosomes (RBS) sont soulignés. L'astérisque indique le codon stop. Les flèches indiquent l'orientation de la traduction.

902 GAGGACGTGCGCCAGTACGAGCAGGCCCTGAAGGAACTCCAGCAGGACAGCCCCGGCCCG 961
 E D V A Q Y E Q A L K E L Q Q D S P G P
 962 GACGAGAGCCGCGACCTCCTGCGCGGTCTGCTGCAACTGTCCTGATCCGCCCCAACTCAG 1021
 D E S R D L L R G L L Q L S * S A P T Q
 1022 GTGACTCGCAAGTAGGATGACGCTCGATCAGACCTGGCGTGGATCTGTGGCCGCTAGCGA 1081
 V T R K * D D A R S D L A W I C G R * R
 →→→
 1082 TTGAGGGGATCACATGTCTGCTCTACTTTCACCGACCTGGCCCCGGCAGTACATCGACGGCGAG 1141
 L R D H M S S Y F T D L A R Q Y I D G E
 1142 TGGCGCCCCGGGCTCGGGCTCCTGGGACGTCATCGACTTCGATCCGTACAACGACGAGAAG 1201
 W R P G S G S W D V I D F D P Y N D E K
 1202 CTGGCCTCGATCACGGTGGCCACGGTCGACGAGGTGGACCAGGCCTACCAGGCCGCCGCC 1261
 L A S I T V A T V D E V D Q A Y Q A A A
 1262 CGCGCCCAGAAGGAGTGGGCGGAGACCAGCCCGTACACCCGGCGCGGTGTCTTCGAGCGG 1321
 R A Q K E W A E T S P Y T R R G V F E R
 1322 GCGCTGCGCCTGATCGAGGACCGCGAGCAGGAGATAGCCGAGCTGATCGTCGCGGAGCTG 1381
 A L R L I E D R E Q E I A E L I V A E L
 1382 GGGCGCACCCGGGTGAAGGCCGGCTTTCGAGCTGCACCTCGCCAAGGAGTTCTGCGCGAG 1441
 G G T R V K A G F E L H L A K E F L R E
 1442 GCGGTCCACCTCGCGCTGCGCCCCGAGGGCAGGATCCTGCCGTCGCCCCGTCGACGGCAAG 1501
 A V H L A L R P E G R I L P S P V D G K
 1502 GAGAACCGCGTCTACCGGATGCCGGTCGGCGTCGTCGGCGTGATCAGCCCCCTTCAACTTC 1561
 E N R V Y R M P V G V V G V I S P F N F
 1562 CCCTTCCTGCTGTGCTGCTGAAGTCGGTCGCCCCGGCCCTTTCGCTCGGCAACGCCGTGGTG 1621
 P F L L S L K S V A P A L A L G N A V V
 1622 CTCAAGCCGCACCAGAACACCCCGATCGCCGGCGGCACCCTGATCGCGAAGATCCAGTAC 1681
 L K P H Q N T P I A G G T L I A K I Q Y
 1682 TGCGGCC 1688
 C G

Fig. 16 (suite).

Séquence nucléotidique et en acides aminés du fragment *Not* I-*Sac*II de 1688 pb (1,7 Kb) provenant du clone pMH31.

été localisés sur la séquence nucléotidique. La comparaison de la séquence en acides aminés de l'ORF 286 (fig. 16) avec celles des bases de données Swissprot et GenBank a montré une forte homologie avec une protéine hypothétique SC5C7.22C chez *S. coelicolor* (Redenbach *et al*, 1996) avec un pourcentage d'homologie de 43% sur 271 a.a.. Un alignement de la séquence en acides aminés de l'ORF 286 de *Streptomyces* sp. EF-14 et celle de la protéine hypothétique SC5C7.22c de *S. coelicolor* est illustré à la figure 17. Une homologie a également été obtenue avec une protéine SC9B2.16c, protéine d'attachement à l'ADN chez *S. coelicolor* (Redenbach *et al*, 1996) avec un pourcentage d'identité de 32% sur 270 a.a.. Les deux protéines SC5C7.22c et SC9B2.16c de *S. coelicolor* contiennent dans leur séquence en acides aminés un motif HTH (hélix-turn-helix) retrouvé généralement dans les séquences protéiques des facteurs de transcription. Une analyse de la séquence en acides aminés de l'ORF 286 à l'aide du programme HTH établi par Dodd et Egan (1990) prédisant si une protéine contient un motif HTH a été ainsi effectuée. Un motif HTH probable a été localisé entre les positions 17 et 38 de l'ORF 286 (fig. 17) mais avec un score non significatif de 1,37 alors que le score du motif HTH localisé entre les positions 29 et 50 de la séquence de SC5C7.22c était de 4,40. Ce qui nous amène à conclure que l'ORF 286 ne contient pas de motif HTH.

L'ORF 198 incomplète débute avec un codon d'initiation ATG au nucléotide 1094 et un RBS possible (nucléotide 1082 à 1086) a été identifié en amont de ce codon d'initiation (fig. 16). Cependant, le promoteur n'a pas été localisé en amont de ce site RBS. A l'aide des bases de données SwissProt et GenBank, nous avons pu comparer la séquence en acides aminés de l'ORF 198 avec celles d'autres gènes. Une forte homologie a été obtenue avec la benzaldéhyde déshydrogénase de plusieurs organismes, notamment *B. subtilis* (Yamamoto *et al*, 1997) avec 54% d'identité sur 190 a.a., *S. coelicolor* (Redenbach *et al*, 1996) avec un pourcentage d'identité de 36% sur 154 a.a. et *Pseudomonas putida* (Inove *et al*, 1995) avec 47% d'identité sur 165 a.a. Un alignement de la séquence en acides aminés de l'ORF 198 et celle de la benzaldéhyde déshydrogénase de *B. subtilis* est représenté à la figure 18.

```

ORF286 VSAGEPGSVVRRMLLGSQRLRLREARGITREAAGYSIRASESKI SRMELGRVSFKTRDVE
      . : . . . : . . . . . : . : : . . . . . : . . . . . : . :
S.coe. MSERRAAPTVGQVVLGRRLQELRETAGLKREEAAKVL RVAPATVRRMEMAEVSLKIPYVQ
      10          20          30          40          50          60

ORF286 DLLTLYGITDEAERESLLSLAREANVAGWWHSYTDVLP SWFPTYVGLEGAASLIRAYEVQ
      : : : . . . . : . . . . . : : : : : : : : : : : : . . . . .
S.coe. ILLTAYGVASD-EVAAFVALAEEANQPGWWQRYHDVLPDWFSLYVSLEGAARIVRSYEPH
      70          80          90          100         110

ORF286 FVHGLLQTEEYARAVVRRGMKGASVAD- VERRVALRLERQKYLLSANAPEFHIVLDEAAL
      : : : . . . . . : : . : : : . . . . . : : . . . . . :
S.coe. FVPGLLQTEDYARSVLEAGTIGNAGADAV ERHVSLRMERQRLDRPDPPHLWVVMDETIVL
      120         130         140         150         160         170

ORF286 RRPYGDR-EVMRGQLQHLIDLSE RPKVRLQVMPFSLGGHSGESGAFTILSFPE SDLSDVV
      : : : . . : : : . . . . . : : : : : : : : : : : : : : : :
S.coe. RRPVSIHGRVMREQLDKLL EFAARDRVTLQVAEFEDGPHPGTYAPFTLFRFAEP ELPDMV
      180         190         200         210         220         230

ORF286 YLEQLTSALYLDKREDVAQYEQALKE LQQDSPGPDERSRDLLRGLLQLS
      . : : . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . . :
S.coe. FTEYLTGALYLD SRTEVSAHLEVL DHMTARAASTQRTEKVLREYRENF
      240         250         260         270         280

```

Fig. 17. Analyse comparative de la séquence en acides aminés de l'ORF 286 (séquence du haut) avec celle de la protéine hypothétique SC5C7.22c de *S. coelicolor* (séquence du bas). Un point double indique un acide aminé identique et un point simple indique un acide aminé similaire. Les séquences sont numérotées à partir du premier acide aminé traduit.

```

ORF198 FTDLARQYIDGEWRPGSGSWDVIDFDPYNDEKLASITVATVDEVDAQAYQAAARAQKEWAE
      . . : . . : . . : . . : . . : . . : . . : . . : . . : . . :
B.Subt YEELNKQFIGGKWQEGSSPNVLENKNPYTQKTFTTFRKATADDVDEAYRAAALAKKKWDA
      10          20          30          40          50          60

ORF198 TSPYTRRGVFERALRLIEDREQEIAELIVAELGGTRVKAGFELHLAKEFLREAVHLALRP
      . . . . . : . . . . . : . . : . : : . . : . . : . . : . . : . . :
B.Subt VNPFEKRTILEKAVTYIEENEEAIIYLIMEELGGTRLKAAFEIGLVKNIIEKAATFPIRM
      70          80          90          100          110          120

ORF198 EGRILPSPVDGKENRVYRMPVGVVGVISPFNFPFLLSLKSVAPALALGNAVVLKPHQNTP
      . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . . :
B.Subt EGKILPSTIDGKENRLYRVPAGVVGVISPFNFPFFLSMKSVAPALGAGNGVVLKPHEETP
      130          140          150          160          170          180

ORF198 IAGGTLIAKI
      : . . . . :
B.Subt ICGGTLIAKI
      190

```

Fig. 18. Analyse comparative de la séquence en acides aminés de l'ORF 198 (séquence du haut) avec celle de la benzaldéhyde déshydrogénase de *B. subtilis* (séquence du bas). Un point double indique un acide aminé identique et un point simple indique un acide aminé similaire.

Le fragment *Sma* I-*Sma* I de 1,6 Kb provenant du fragment *Not* I- *Sca* I de 2,9 Kb (fig. 7B) qui émettait un signal avec la sonde KF-1 a été sous-cloné dans pBluescript SKII⁺ (pMH318C) et SKII⁻ (pMH318D) afin de déterminer la séquence en nucléotides sur les deux brins d'ADN de ce fragment. La figure 19 illustre une partie de la séquence en nucléotides du fragment *Sma* I-*Sma* I obtenue avec le sous-clone pMH318C. Dans cette séquence de 668 nucléotides, les 15 bases soulignées (5'--GCCCAGGTCAGGGCC--3') sont celles qui hybridait avec l'oligonucléotide KF-1 de 17 nucléotides (5'-GCSCAGGTSTGGGTSAC-3'). La traduction de la séquence nucléotidique de 668 bases dans les six cadres de lecture ne nous a pas permis de retrouver les 15 acides aminés de la portion N-terminale de la β -1,6-glucanase purifiée chez *Streptomyces* sp. EF-14. La comparaison de cette séquence de 668 nucléotides avec celles des bases de données Swissprot et GenBank à l'aide de l'algorithme de comparaison de séquences Blast X (Gish et States, (1993); Altschul *et al*, 1990)) a montré une très faible homologie avec le collagène alpha de plusieurs organismes dans le cadran de lecture -3 (résultats non montrés). Ce sont toutes des séquences très riches en résidus de glycine et de proline, résultat du taux élevé de nucléotides G et C dans l'ADN des actinomycètes. Il reste donc à séquencer le fragment d'ADN *Not* I-*Sca* I de 2,9 Kb au complet pour une analyse plus exhaustive. Des séquences nucléotidiques des sous-clones pMH315, pMH318D et pMH319 dérivés de pMH31 portant tous des fragments d'ADN provenant du fragment *Not* I-*Sca* I de 2,9 Kb ont été déjà déterminées (annexe 2; fig. 22, 23 et 24).

2.6 Transfert de la banque génomique de EF-14 dans *S. lividans* TK-24

La transformation des protoplastes de *S. lividans* TK-24 avec 1,5 μ g d'ADN de la banque génomique amplifiée a généré environ 12 000 transformants. L'ajout de l'agarose mou contenant du pustulane (10 g/L) comme source de carbone et de la kanamycine (1,25 mg/ml) sur les protoplastes régénérés a permis la sélection de deux colonies, TK-24(clo1) et TK-24(clo2). Ces deux transformants repiqués sur le milieu T-PUST montraient une zone d'hydrolyse claire autour

5' --- SmaI

```
1  GGGACTCTGCTGCCGGTGCTGGCCACGCGCGCATAGCCGTGACCGGCCGGCTGGAGCGG  60
61  ATGTTCCCGCAGACCACGACGTCCCGGCTGCTGGGCGTCAGCGACGCGGCCGGGCTGGCC  120
121  CGAGGGCGCCCGAGCGGCGGACCGGGCCCAGGTCAGGGCCCGCCGCGGCTGGAGTGACC  180
181  CGCGCCTCAGTCGCCGACCTGCTGGAAGGCGCCACGGAGGCGTTTCGGGCTGGTTCCCGC  240
241  CGGCCTTCCCGGCGACCGGGCCGTACTTCCACGGGAAGCTGCGGCTGGTGTGGGTGCCGG  300
301  GCAGGGTGATCTTCACGGTCTGTGCCGCCAGGGTGTTCCGCGCGCCGTCCGCCCCGCGCA  360
361  CATAGCTGACGGAGAAGGTGCGGGAGTCGCCCTTGGCCAGCTTCAGCTTCTGGGCCTTCG  420
421  CGCCCTTGAGCACGGGCACGGCGGCCTCCTTGCCGCCGAGCCCAGCACGACCTCGGGGA  480
481  AGTGGTCCACGCTCCAGGGCGCGCTCTGGTTCGTGAGGCTGACCGGGATCTCGCCGCTGT  540
541  CCCC GGCCCGCCGGGGCCACGCTCGCGGACCCAATCTGGACGGACACGAGGGGGATCTTCG  600
601  CACGCCCAAGCCGGCGCTGTTGCACTTCTTCGCCCCGACCGTGGTCCCACCCAGCGAACA  660
661  CACGGCCC  668
```

Fig. 19. Séquence en nucléotides du fragment *SmaI-SmaI* de 1,6 Kb provenant du clone pMH31 et sous-cloné dans le plasmide pBluescript SKII⁺ (sous-clone pMH318C). Les bases soulignées sont celles qui hybridait avec la sonde KF-1. La séquence est numérotée à partir du site *SmaI* en 5'.

d'eux. Le diamètre de la zone d'hydrolyse est légèrement plus grand que celui délimité par *S. lividans* TK-24 transformée avec le plasmide pFD666 puisqu'elle dégrade elle-même faiblement le pustulane (résultats non-montrés). Par ailleurs, l'extraction des ADN plasmidiques des clones de TK-24(clo1) et TK-24(clo2) a mis en évidence la présence de plasmide, dérivés du vecteur pFD666, ayant une taille d'environ 20 Kb pour ces deux clones (résultats non-montrés).

Des protoplastes de TK-24 ont été transformés avec le plasmide pMH31 amplifié dans *E. coli* DH10B. Après la sélection des transformants à l'aide de l'agar de surface contenant la kanamycine (1,25 mg/ml), quatre colonies TK-24(pMH31) ont été repiquées sur le milieu T-PUST pour vérifier l'activité β -1,6-glucanase. Malheureusement, aucune zone de dégradation véritable n'a été observée autour des colonies puisque le contrôle *S. lividans* TK-24 transformée avec pFD666 présentait autour d'elle un diamètre de dégradation égal à celui du clone TK-24(pMH31).

Nous avons par la suite essayé de doser l'activité β -1,6-glucanase dans le surnageant de culture des différents clones de TK-24. Les spores des transformants de *S. lividans* TK-24 soient TK-24(pMH31) et TK-24(clo1) ainsi que le contrôle TK-24(pFD666) ont été inoculés dans différents milieux liquides. Des échantillons ont été prélevés après différents temps d'incubation et le dosage de l'activité β -1,6-glucanase s'est effectué selon la méthode de Nelson-Somogyi (matériel et méthodes, section 2.10). Pour le clone TK-24(pMH31), une très faible quantité de sucres réducteurs de l'ordre de $27,18 \times 10^{-3}$ μ moles/ml a été produit avec l'échantillon de 24 heures d'incubation. Ce qui n'est pas significatif. Les surnageants prélevés des milieux MBSM-amidon et MPA-pustulane utilisés pour le clone TK-24(pMH31) et des milieux CU, PU et AM pour le clone TK-24(clo1) ne contenaient pas de β -1,6-glucanase puisqu'il n'y avait aucune production de sucres réducteurs lors de la réaction avec le substrat, le pustulane (2,5 mg/ml).

2.7 Mécanisme d'action de la β -1,6-glucanase purifiée chez *Streptomyces* sp. EF-14

Des digestions partielles effectuées sur le pustulane par la β -1,6-glucanase à différents temps d'incubation montraient que la quantité de sucres réducteurs produits augmente avec le temps. Le dosage des sucres réducteurs au PAHBAH 0,5% (Matériel et méthodes, section 2.11) des échantillons prélevés aux temps d'incubation de 5 min, 20 min et 60 min, indiquaient une production de sucres réducteurs, respectivement de 0,392 μ moles/ml, 0,962 μ moles/ml et 2,324 μ moles/ml. Cependant, l'examen par chromatographie sur couche mince (CCM) des produits d'hydrolyse du pustulane par la β -1,6-glucanase purifiée pour ces incubations de courte durée n'avait pas permis d'observer la séparation des oligosaccharides de haut poids moléculaire générés par la digestion (fig. 20). Après 24 heures d'hydrolyse du pustulane par l'enzyme purifiée, le dosage des sucres réducteurs au PAHBAH 0,5% avait indiqué une production de 4,18 μ moles/ml de sucres réducteurs. La migration de ce produit de digestion laissait observer sur la CCM qu'en plus de la libération des oligosaccharides de haut PM, il y avait une production de glucose et de gentiobiose (fig. 20). Au fur et à mesure que l'incubation continuait ces oligosaccharides de haut PM étaient clivés en gentiobiose et en glucose qui représentent donc les produits finaux d'hydrolyse.

La β -1,6-glucanase purifiée chez *Streptomyces* sp. EF-14 a été incubée avec la laminarine (β -glucane linéaire formée uniquement de liens glycosidiques β -1,3-) pendant 17 heures. Le dosage de la quantité de sucres réducteurs selon la méthode de Nelson-Somogyi a révélé que cette enzyme n'avait aucune activité sur la laminarine. Une CCM du produit d'hydrolyse de la laminarine et du pustulane avait été effectuée précédemment par Fayad (1997). Ce qui avait laissé observer que pour un même temps de réaction d'hydrolyse du substrat par l'enzyme (17 heures), la laminarine ne libérait aucun produit de digestion contrairement au pustulane qui libérait des oligosaccharides de haut PM. Une incubation du gentiobiose avec la β -1,6-glucanase purifiée a été effectuée pendant 24 heures et 48 heures. Le dosage de sucres réducteurs des produits d'incubation en utilisant du PAHBAH 0,5% a révélé qu'il n'y a pas de production de sucres réducteurs.

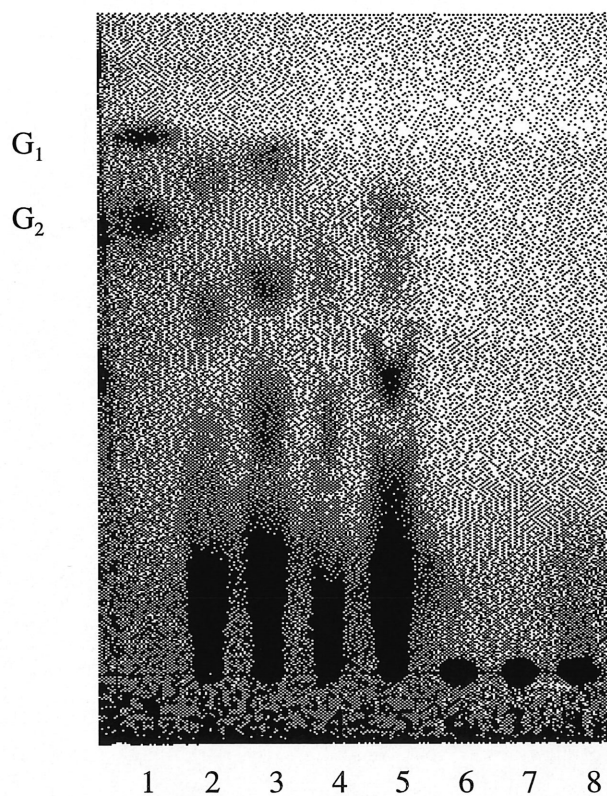


Fig. 20. Analyse des produits d'hydrolyse du pustulane libérés par l'action de la β -1,6-glucanase purifiée pendant différents temps de digestion: 5 min, 20 min, 60 min et 24 heures. Standards G_1 : glucose et G_2 : gentiobiose.

- 1: Glucose + gentiobiose
- 2: Digestion de 24 heures
- 3: Même que 2
- 4: Digestion de 24 heures (le produit a été concentré)
- 5: Même que 4
- 6: Digestion de 5 min
- 7: Digestion de 20 min
- 8: Digestion de 60 min

CHAPITRE 3

DISCUSSION

Les β -1,6-glucanases sont des enzymes très peu étudiées comparativement aux β -1,3- et β -1,4-glucanases. Jusqu'à présent, il n'y a relativement que très peu d'informations sur leur structure moléculaire. A l'heure actuelle, seul le gène de la β -1,6-glucanase provenant du champignon *Trichoderma harzianum* a été cloné et séquencé (Lora *et al.*, 1996; Kofod *et al.*, 1998). L'étude moléculaire du gène codant pour la β -1,6-glucanase provenant de l'actinomycète *Streptomyces* sp. EF-14, protéine purifiée dans notre laboratoire (Fayad, 1997) est un domaine très intéressant à explorer puisqu'aucun gène de β -1,6-glucanase bactérienne n'a encore été cloné et séquencé. Les objectifs principaux de cette étude se résument en deux points: le clonage et l'expression du gène codant pour cette β -1,6-glucanase.

Une banque génomique totale *Bgl*III de *Streptomyces* sp. EF-14 a été construite dans *E. coli* DH10B afin de sélectionner rapidement les clones qui étaient β -1,6-glucanases positifs. Bien que *E. coli* ne soit pas un excellent sécréteur d'enzymes comparé aux actinomycètes, le phénomène d'autolyse fait en sorte que les enzymes codées par des gènes clonés soient relâchées dans le milieu environnant. Il en résulte une production de zones de dégradation du substrat autour des clones positifs.

Deux méthodes de criblage de la banque génomique totale *Bgl*III ont été utilisées dans cette étude. La première, la détection phénotypique, a permis de sélectionner le clone pMH31. Puisque le plasmide pMH31 transformé dans la souche de *E. coli* DH10B permettait à cette dernière de dégrader le pustulane, seule source de carbone contenu dans un milieu minimum, et que le contrôle DH10B(pFD666) n'avait pas d'activité dégradante, nous pensons que ce clone porte le gène codant pour une β -1,6-glucanase. Les résultats du traitement de la souche DH10B(pMH31) à la coumermycine A₁ (5 mg/ml) à 37°C viennent confirmer cette hypothèse puisque l'élimination du plasmide pMH31 de DH10B enlève à cette dernière sa capacité de

dégrader le pustulane contenu dans le milieu M9-PUST.

D'autre part en repiquant la souche DH10B (pMH31) sur plusieurs milieux minimum contenant d'autres sources de carbone (laminarine ou cellulose), nous avons constaté que ce clone dégradait également la laminarine qui est un β -1,3-glucane. Ce qui pourrait suggérer la présence à la fois, dans l'insert de 8,55 Kb du clone pMH31, d'un gène de la β -1,6-glucanase et d'un autre gène qui coderait pour une β -1,3-glucanase. Une autre possibilité serait la présence d'un gène qui coderait pour une protéine reconnaissant autant les liens β -1,3- que les liens β -1,6-glycosidiques. De telles β -1,6-glucanases ont été décrites chez *Acremonium persicinum* (Pitson *et al*, 1996), *Mucor hiemalis* (Miyazaki et Oikawa, 1976), *Rhizopus chinensis* (Yamamoto *et al*, 1974), *Neurospora crassa* (Hiura *et al*, 1987) et *Acinetobacter* sp. (Katohda *et al*, 1979). Si le clone pMH31 porte le gène codant pour cette dernière catégorie de β -1,6-glucanases, ce ne serait nécessairement pas le gène de l'enzyme qui a été purifiée chez *Streptomyces* sp. EF-14 par Fayad (1997). Il faut noter que la souche EF-14 sécrètent également une variété de β -glucanases incluant les β -1,3-, les β -1,4-glucanases et possiblement d'autres β -1,6-glucanases qui lui confèrent un bagage enzymatique à caractère lytique vis-à-vis des levures comme *Candida tropicalis* et des champignons comme *Phytophthora* qui ont des parois cellulaires riches en β -glucanes (Fayad, 1997).

Nous avons rencontré des problèmes majeurs lors du clonage du gène de la β -1,6-glucanase. Le plasmide pFD666 portant un insert d'ADN, lorsque transformé dans la souche de *E. coli* DH10B, était instable. Il en résultait de sévères délétions, voire même une perte totale de l'insert. Ce phénomène avait également été observé avec les souches de *E. coli* DH5 α F' et XLI-BLUE MRF'. Dans la littérature, des cas d'instabilité générées par l'ADN étranger avaient déjà été discutés (Motamedi et Hutchinson, 1987). Lors du criblage de la banque génomique totale par la méthode de détection phénotypique, 3 clones préliminaires dégradant le pustulane avaient été obtenus (résultat non-montré). Après une amplification et une extraction plasmidique de ces

clones, nous avons constaté que deux d'entre eux avaient complètement perdu l'insert, laissant intact le plasmide pFD666. Ce résultat suggérait alors une instabilité dans le système de restriction endogène de l'hôte utilisé, *E. coli* DH10B. Pour surmonter ce problème, les transformants de DH10B étaient dorénavant incubés à une température un peu plus basse, 30°C au lieu de 37°C comme nous l'avait recommandé le fabricant. En ajustant ainsi la température la souche DH10B a été retenue pour la construction de la banque génomique totale.

En ce qui concerne le criblage par détection phénotypique de la banque génomique partielle *Bam*HI construite dans *E. coli* XLI-BLUE, quelques hypothèses ont été formulées pour expliquer l'absence de clones β -1,6-glucanases positifs. Une première hypothèse tient compte du fait que le gène codant pour cette protéine serait coupé par l'enzyme de restriction *Bam*HI lors de la digestion partielle de l'ADN génomique de *Streptomyces* sp. EF-14, avant même le clonage. Il en résulterait une protéine incomplète donc inactive. Une seconde hypothèse porte sur l'instabilité des inserts clonés dans le plasmide pUC119 puisque le phénomène d'instabilité avait été observé chez le hôte de clonage, *E. coli* XLI-BLUE, lorsqu'il était incubé à 37°C.

Une des grosses lacunes dans notre arsenal expérimental était l'absence d'un hôte hétérologue chez les actinomycètes, ne produisant pas de β -1,6-glucanase, pour l'expression de l'ADN du clone pMH31. Par défaut, nous avons choisi *S. lividans* TK-24 pour sa facilité à être transformé avec de l'ADN étranger et surtout pour sa faible capacité de dégrader le pustulane. Le problème rencontré était surtout le fait que cette souche possédait déjà le gène de la β -1,6-glucanase que nous projetons de cloner. Lorsque la souche TK-24 était transformée avec le clone pMH31, il n'y avait pas de surexpression de la β -1,6-glucanase contrairement à la souche DH10B(pMH31) que ce soit sur milieu solide ou en milieu liquide contenant du pustulane comme seule source de carbone. Pourtant, selon Denis et Brzezinski (1992), le plasmide pFD666 contient un promoteur très puissant et dirigerait la transcription du gène *neo* continuant avec la transcription du gène cloné. Si l'insert de pMH31 était cloné dans la même orientation que le

gène *neo*, il y aurait une surexpression de la β -1,6-glucanase dans le cas contraire, le promoteur du gène cloné dirigerait lui-même la transcription à moins que ce promoteur ne soit pas cloné avec le gène d'intérêt. Il se pourrait aussi que le gène endogène toujours présent interfère avec l'étude du gène cloné. Par ailleurs, selon Ghangas *et al*, (1989), un gène cloné et exprimé chez *E. coli* s'exprime habituellement chez le hôte hétérologue à des quantités de protéine de 10 à 20 fois plus élevées. C'est l'inverse qui a été observé dans notre cas puisqu'il n'y avait aucune activité chez *S. lividans*. Une autre explication suggérée pour le manque d'activité, étant donné les phénomènes d'instabilité de l'insert d'ADN étranger rencontré chez TK-24, serait la perte d'une petite séquence d'ADN de l'insert du clone pMH31, due à l'intégration d'un segment d'ADN par recombinaison avec le génome de la souche TK-24 et la formation d'une molécule plasmidique ayant un insert diminué. La conséquence d'un tel phénomène pourrait être une suppression de l'activité biologique par interruption du cadran de lecture. De toute façon nous ne pouvons pas affirmer avec certitude que le gène cloné soit correctement régulé dans cette souche hétérologue.

Des tentatives de production de la β -1,6-glucanase par la souche TK-24(pMH31) dans les milieux liquides MBSM-amidon et MPA-pustulane ayant échoué, nous avons opté pour l'extraction de protéines périsplasmiques de la souche de *E. coli* DH10B transformée avec le plasmide pMH31, selon le protocole de Manoil et Becwith (1986). Seulement 3 ml de milieu de production était utilisé pour effectuer l'extraction. Malheureusement, après le dosage des sucres réducteurs du produit de réaction de l'extrait périsplasmique avec le pustulane, nous avons constaté qu'il n'y avait que de faibles quantités non significatives (de l'ordre de 0,074 μ mol/ml) de sucres réducteurs produits et par conséquent une quantité négligeable de β -1,6-glucanase produite en milieu liquide par la souche DH10B(pMH31). Il serait donc sage de mettre sur pied des conditions optimales de production de cette enzyme, à grande échelle, en milieu liquide, d'autant plus que sur milieu minimum solide (M9-PUST), une zone de dégradation du pustulane était visible à l'oeil nu (fig. 2). Nous nous reprochons à ce niveau le fait d'avoir utilisé le milieu

TB liquide qui est un milieu riche, pour produire la β -1,6-glucanase par DH10B(pMH31) étant donné que le phénomène de répression catabolique était déjà observé chez *Streptomyces* sp. EF-14, souche à partir de laquelle a été cloné ce gène. Il serait peut-être intéressant de dresser un antisérum contre la β -1,6-glucanase purifiée et l'utiliser dans un test d'hybridation de type "Western" pour détecter la présence de cette protéine dans l'extrait de protéines périsplasmiques provenant de DH10B(pMH31). Une autre suggestion très intéressante serait de produire un polypeptide synthétique à partir de la séquence N-terminale de cette β -1,6-glucanase afin de produire des anticorps qui vont prouver l'existence de la protéine.

Comme mentionné dans la section Résultats, des expériences supplémentaires nous ont permis de constater qu'en présence du pustulane et d'une autre source de carbone, qu'il y avait un phénomène de répression catabolique (tableau III). Lorsque DH10B(pMH31) était repiquée sur un milieu riche contenant 6 g/L de TSB additionné de 10 g/L de pustulane, il n'y avait aucune zone de dégradation produite. De plus, nous avons noté qu'en remplaçant l'agarose du milieu M9-PUST par de l'agar, la dégradation du pustulane était moins importante. Cela s'explique par le fait que l'agarose ne représente qu'une minorité des composés de l'agar qui est un polysaccharide hautement hétérogène (Yaphe et Duckworth, 1972). Des cas de répression catabolique des β -1,3- et β -1,6-glucanases par le glucose et d'autres sources de carbone étaient déjà étudiés chez le champignon *Neurospora crassa* par Del Rey *et al* (1979). Suite à la production de zone de dégradation évidente sur le milieu M9-PUST solide, nous concluons que le milieu M9-PUST liquide pourrait être un excellent candidat pour la production de la β -1,6-glucanase. Jusque là, la seule preuve évidente qui nous amène à penser que nous avons cloné le gène de la β -1,6-glucanase est la dégradation du pustulane contenu dans le milieu M9-PUST par la souche DH10B portant le plasmide pMH31 (fig.2).

Des expériences additionnelles pourraient encore prouver hors de tout doute que c'est bien le gène de la β -1,6-glucanase qui a été cloné. L'approche la plus simple et la plus fiable d'y

arriver serait de séquencer l'insert d'ADN cloné et de retrouver dans la séquence en acides aminés déduite, les 15 a.a. de la portion N-terminale de la protéine purifiée.

Deux oligonucléotides KF-1 et KF-2 ont été synthétisés en se basant sur la séquence N-terminale de la β -1,6-glucanase purifiée. Le premier oligonucléotide KF-1 (5'-GCSCAGGTSTGGGTSAC-3') hétérogène est un mélange de huit oligonucléotides synthétiques représentant toutes les séquences nucléotidiques possibles pouvant coder pour la même séquence protéique choisie. Le nucléotide S dans la séquence de KF-1 remplace un G ou un C car à cause de la dégénérescence du code génétique, certains des acides aminés choisis pour la synthèse de l'oligonucléotide sont codés par plusieurs codons. Ainsi, il existera forcément dans ce mélange un des séquences oligonucléotides qui correspondra à la séquence du gène d'intérêt recherché. Le deuxième oligonucléotide KF-2 a été synthétisé en se basant sur KF-1, tous les codons dégénérés étant remplacés par les codons les plus fréquents dans la table d'usage des codons chez les Streptomycètes (Bibb *et al*, 1984).

Lors d'une première expérience d'hybridation de l'ADN génomique de *Streptomyces* sp. EF-14 avec chacun des deux oligonucléotides marqués au γ - ^{32}P -dATP, plusieurs signaux étaient obtenus, avec des patrons similaires pour les deux sondes. Puisque la sonde KF-2 donnait également beaucoup de signaux au lieu d'un seul dans une région précise, nous avons décidé de poursuivre le criblage de la banque génomique avec seulement la sonde KF-1 dont les résultats d'hybridation sont représentés à la figure 1. L'une des raisons probables de la multiplicité de signaux sur l'autoradiogramme pourrait être la non spécificité de la sonde hétérogène qui pourrait s'hybrider à des séquences présentant une faible homologie.

Comme mentionné dans la section Résultats, le criblage de la banque génomique totale *Bg*/III par hybridation en utilisant la technique "SIB selection", a permis la sélection de trois clones positifs H5(26) et S4(13) dont les séquences en ADN des fragments homologues à la

sonde KF-1 ont été déterminées et le clone Q3(16) qui était très instable et pour lequel juste le test de dégradation du pustulane sur pétri avait été effectué. Malheureusement tous ces clones ne présentaient aucune activité β -1,6-glucanase et par conséquent ils étaient tous des faux positifs. À ce niveau, nous pensons que nos conditions d'hybridation sont encore à optimiser. La sonde KF-1 avait hybridé avec une séquence nucléotidique de la glutamate synthase ferredoxine-dépendante portée par un fragment d'ADN du clone H5(26) avec un rapport de 13 nucléotides sur 17 (fig. 9) et avec une séquence nucléotidique de l'histidine kinase portée par un fragment du clone S4(13) dans un rapport de 7 nucléotides sur 17 (fig. 13), à deux endroits différents dans la séquence nucléotidique. Cette affinité non spécifique entre la sonde et ses matrices est surtout due aux conditions d'hybridation qui n'étaient pas adéquates. L'hybride formé entre le fragment du clone H5(26) et la sonde KF-1 avait une t_m de 44°C alors que le t_m de l'oligonucléotide KF-1 était de 58°C. L'hybridation s'était effectuée à 42°C et le lavage final à 45°C. Lathe (1985) confirme que l'hybridation est très souvent effectuée de 5 à 25°C en dessous de la température de fusion (t_m) de l'hybride et cela permet la formation d'hybrides imparfaits entre la sonde et les séquences qui lui sont faiblement homologues. L'étape critique pour obtenir un hybride sonde-séquence cible parfait implique l'étape de lavage final à haute stringence, pour une période limitée, sous de conditions de sel et de température approchant le t_m de l'hybride désiré. Dans notre cas, la stringence était faible puisque la température de lavage (45°C) était très éloignée de celle de l'hybride (58°C). Ce qui explique la sélection des faux positifs. D'autre part, la haute stringence entre un hybride sonde-cible parfait pourrait échouer si de petites erreurs survenaient dans la détermination de la séquence en acides aminés ou dans la synthèse d'un mélange d'oligonucléotides contenant différentes séquences nucléotidiques (Lathe, 1985).

Bien que la technique "SIB selection" ne nous ait pas permis de cribler le clone portant le gène de la β -1,6-glucanase, mentionnons que l'approche utilisant un mélange d'oligonucléotides quant à elle, est très utilisée en biologie moléculaire et l'isolement, entre

autres, des séquences codant pour des protéines humaines telles que l'adénosine désaminase (Orkin *et al*, 1983) et la protéine C-réactive (Whitehead *et al*, 1983) a été réussi avec succès grâce à un mélange de 64 séquences et de 8 séquences d'oligonucléotides respectivement. Chaque séquence étant constituée de 17 nucléotides seulement.

Les erreurs de séquençage survenues lors de la détermination des séquences d'ADN seraient attribuées à un ajout ou une suppression d'un ou plusieurs nucléotides dans la séquence nucléotidique au niveau du séquenceur automatique. Ceci pourrait être le résultat d'une concentration élevée d'ADN sb soumis au séquençage ou tout simplement à la mauvaise qualité d'ADN sb produit. Pour avoir une séquence d'ADN sans erreur, il faudrait donc s'assurer de la bonne qualité et de la bonne concentration de l'ADN sb avant de le soumettre au séquenceur. Il serait aussi très intéressant de séquencer les deux brins d'ADN du même fragment pour écarter éventuellement le phénomène d'ajout ou de suppression de nucléotides dans une séquence nucléotidique.

La digestion du clone pMH31 avec plusieurs enzymes de restriction et l'hybridation des différents fragments d'ADN avec la sonde KF-1 avaient permis de localiser la région homologue à cette sonde sur un fragment *Not I-Sca I* de 2,9 Kb plus précisément sur le fragment *Sma I-Sma I* de 1,6 Kb (fig. 7B). Un deuxième fragment d'environ 0,3 Kb émettait également un signal avec la sonde KF-1. Mais après le lavage de la membrane à une température plus élevée, ce signal avait fini par disparaître. Il représentait alors un signal non spécifique. Le séquençage et l'analyse du fragment *Not I-SacII* de 1,7 Kb en aval du fragment de 2,9 Kb à l'aide du programme FRAME avait permis de localiser deux ORFs de 198 et 286 acides aminés. L'ORF 198 incomplète codait avec certitude pour une benzaldéhyde déshydrogénase alors que l'ORF 286 qui était complète code pour une protéine inconnue ayant une homologie significative avec une protéine hypothétique SC5C7.22c et une protéine d'attachement à l'ADN provenant toutes les deux de *S. coelicolor*. La dissimilitude entre l'ORF 286 et ces deux protéines réside dans le fait

que celles-ci possèdent un motif HTH comme celui retrouvé dans la séquence protéique des facteurs de transcription alors que l'ORF 286 n'en possède pas un. Par ailleurs, l'analyse de la séquence nucléotidique en aval du codon stop de l'ORF 286 n'a pas permis la localisation d'un terminateur de transcription. Ce qui empêcherait le décrochage de l'ARN polymérase et une continuation de la transcription donnant suite à l'ORF 198 de la benzaldéhyde déshydrogénase. Une hypothèse émise est que la protéine de l'ORF 286 serait impliquée dans l'activation de transcription du gène de la benzaldéhyde déshydrogénase situé juste en aval. Mentionnons qu'il est connu chez les actinomycètes que certains gènes codant pour des enzymes, comme la métalloprotéase chez *S. coelicolor* (Dammann et Wohlleben, 1992), sont regroupés avec les gènes codant pour leurs activateurs de transcription. En conclusion, le séquençage du fragment *NotI-SacII* de 1,7 Kb ne nous a pas permis de localiser et d'orienter le gène probable codant pour la β -1,6-glucanase comme nous le prévoyions. Il faudrait séquencer en totalité le fragment *NotI-ScaI* de 2,9 Kb (fig. 7) adjacent pour être sûr que ce fragment porte hors de tout doute le gène de la β -1,6-glucanase. Une autre alternative serait de construire et de tester plusieurs sous-clones de pMH31 pour localiser le gène de la β -1,6-glucanase par activité sur le milieu M9-PUST afin de le séquencer éventuellement.

La caractérisation physico-chimique de la β -1,6-glucanase purifiée chez *Streptomyces* sp. EF-14 a permis déterminer son PM à 66 KDa. En se basant sur les données standard du calcul de la taille d'ADN codant pour une protéine, fixant à 1 Kb la taille d'ADN codant pour 333 a.a. avec un PM de 36 000 Da, nous avons estimé la taille d'ADN pouvant coder pour la β -1,6-glucanase à 1,8 Kb. En ajoutant les éléments tels que le promoteur et le terminateur, le gène complet aurait une taille d'environ 2,5 Kb. Une protéine sécrétée aurait, en amont du gène équivalent, une séquence codant pour un peptide signal qui est un marqueur au niveau de protéine indiquant son devenir extracellulaire. Selon Von Heijne (1988), il est facile d'identifier la séquence d'un peptide signal. Ce sont des séquences qui ont entre 15 et 30 résidus d'acides aminés et toutes présentent trois régions physico-chimiques distinctes: une région-N amino-

terminale chargée positivement, une région-H centrale hydrophobique et une région-C carboxy-terminale polaire. Ces traits caractéristiques ont été retrouvés chez l' α -amylase de *Streptomyces limosus* (Long *et al*, 1987). La séquence du peptide signal de l' α -amylase présentait une région-N contenant deux résidus d'arginine, une région extrêmement hydrophobe et une région-C contenant deux résidus de proline précédant immédiatement l'extrémité amino-terminale de la protéine mature qui expose le site de clivage du peptide signal. Il a été rapporté que les séquences du peptide signal sont plus longues chez les bactéries gram positif (comme les Streptomycètes) que celles des bactéries gram négatif et les eucaryotes (Von Heijne, 1988).

Contrairement aux β -1,3- et β -1,4-glucanases, les β -1,6-glucanases sont relativement très peu étudiées. Récemment, une β -1,6-glucanase provenant de *Streptomyces* sp. EF-14 a été purifiée et caractérisée du point de biochimique (Fayad, 1997). Cette enzyme s'est distinguée de toutes les β -1,6-glucanases caractérisées par son PM élevé (66 KDa). Cependant, cette enzyme a montré plusieurs similarités avec les β -1,6-glucanases décrites parmi lesquelles nous mentionnons l'activité endoglucanolytique et le manque d'action sur l'écorce de levure, la classant parmi les enzymes non-lytiques.

Des analyses additionnelles ont été effectuées avec cette β -1,6-glucanase, pour déterminer son mode d'action par CCM sur divers substrats tels que la laminarine, le gentiobiose et son substrat spécifique qui est le pustulane. Après 17 heures d'incubation de l'enzyme purifiée avec la laminarine, le dosage de sucres réducteurs n'a révélé aucune activité β -1,3-glucanase. De plus, la CCM du produit de digestion de la laminarine ne montrait aucun produit généré alors que pour un même temps de digestion du pustulane, la CCM révélait une traînée d'oligosaccharides de haut poids moléculaire (Fayad, 1997). Ce résultat témoigne donc de l'activité spécifique de l'enzyme purifiée. Déjà après 5 min de digestion du pustulane par la β -1,6-glucanase purifiée, les produits de réaction n'étaient pas visibles sur la CCM mais le dosage des sucres réducteurs par la méthode utilisant le réactif PAHBAH 0,5% révélait une production

de 0,392 $\mu\text{mol/ml}$ de sucres réducteurs. Après 24 heures de digestion du pustulane, la quantité de sucres réducteurs produits avait augmenté et les produits finaux d'hydrolyse (glucose et gentiobiose) étaient visibles sur la CCM (fig. 20). Le glucose ne provenait pas des extrémités de la chaîne du pustulane mais probablement des coupures internes du polysaccharide puisqu'après 17 heures d'incubation de l'enzyme avec le pustulane, seuls des oligosaccharides de haut poids moléculaire étaient visibles sur la CCM (Fayad, 1997). La CCM ne nous permettait pas d'identifier avec précision les oligosaccharides générés au cours de l'évolution d'hydrolyse du pustulane par la β -1,6-glucanase purifiée. Pour cela, il serait très intéressant d'analyser les produits de digestions partielles par chromatographie liquide à haute pression.

Le produit final de digestion du pustulane par la β -1,6-glucanase purifiée chez *Streptomyces* sp. EF-14 est en majorité du glucose, contrairement aux autres β -1,6-glucanases décrites qui ne produisent pas de glucose, ou alors ne produisent que des traces de glucose. Cependant l'incubation de cette enzyme avec le gentiobiose (un dimère de glucose) ne produit pas de glucose. Ce qui confirme encore une fois le mode d'action endoglucanolytique de l'enzyme purifiée. Nous avons alors émis l'hypothèse que la β -1,6-glucanase de EF-14 ne possédait pas d'activité β -glucosidase puisqu'elle n'hydrolysait pas le dimère de glucose. Il serait donc très intéressant de vérifier cette hypothèse en effectuant un test d'inhibition avec du D-glucono-1,5-lactone. Selon Sano *et al* (1975), une enzyme ayant une activité β -1,6-glucosidase est inhibée par le D-glucono-1,5-lactone.

CONCLUSION

La méthode de détection phénotypique utilisée dans cette étude nous a permis de sélectionner le clone pMH31 de la banque génomique totale *Bgl*III de *Streptomyces* sp. EF-14. Ce clone code de toute évidence pour une β -1,6-glucanase puisque la souche de *E. coli* DH10B portant le plasmide pMH31 dégradait le pustulane (β -1,6-glucane) contenu dans un milieu solide. L'analyse de la séquence partielle du fragment d'ADN *Sma* I-*Sma* I de 1,6 Kb (fig. 7) provenant du clone pMH31 et homologue à l'oligonucléotide KF-1 nous a permis de localiser sur ce fragment 15 nucléotides hybridant avec la sonde KF-1. Mais comme la séquence en acides aminés ne présentait pas les 15 acides aminés provenant de la portion N-terminale de la β -1,6-glucanase purifiée chez *Streptomyces* sp. EF-14 et que le clone pMH31 dégradait la laminarine en plus du pustulane, nous avons conclu que c'est un gène qui code pour une protéine reconnaissant autant les liens glycosidiques β -1,3- et β -1,6- qui a été cloné et non pas le gène de la protéine purifiée.

La localisation du gène cloné dans pMH31 codant pour la β -1,6-glucanase et le séquençage de ce gène complet sont envisagés dans un avenir très rapproché dans notre laboratoire. L'identification des éléments génétiques serait indispensable pour tenter par des manipulations génétiques dirigées de surexprimer le gène codant pour cette enzyme chez une souche d'actinomycète hétérologue, ayant des conditions requises pour mieux étudier le gène cloné. Vu le phénomène de répression catabolique observé, les conditions favorisant la surexpression du gène serait également à améliorer pour avoir une production de la β -1,6-glucanase à grande échelle.

Les études sur les β -1,6-glucanases bactériennes ne font que commencer. L'aspect moléculaire en particulier est très intéressant à explorer pour une meilleure compréhension des mécanismes d'action de ces enzymes. Dans ce mémoire, les études présentées ne sont qu'une

partie des informations à recueillir du gène de la β -1,6-glucanase .

Plusieurs gènes de β -1,3- et β -1,4-glucanases ont été clonés et séquencés mais un seul gène de β -1,6-glucanase a été cloné chez le champignon *Trichoderma harzianum* (Lora *et al*, (1995); Kofod *et al*, (1998)). Le clonage et le séquençage du gène de la β -1,6-glucanase bactérienne entamé dans cette étude permettra éventuellement de déterminer sa structure et ses caractéristiques. Une comparaison entre les séquences en acides aminés des β -1,6-glucanases bactériennes et fongiques et une analyse aux rayons X fourniraient plus d'information sur leur site actif qui est jusque-là très peu connu.

ANNEXES

ANNEXE 1

Calcul de l'efficacité de transformation de la banque de gènes

La banque génomique totale *Bgl*III de *Streptomyces* sp. EF-14 dans *E. coli* DH10B a généré en tout 14 700 recombinants portant des inserts de taille moyenne s'élevant à 12,5 Kb. L'efficacité de cette banque a été calculée avec la formule suivante:

$$N = \ln (1 - P) / \ln (1 - x/y)$$

où

N = nombre de recombinants générés

P = efficacité

x = longueur moyenne des inserts en pb

y = longueur moyenne du génome de la souche bactérienne utilisée

Ici,

N = 14 700 recombinants

P = ?

x = 12 500 pb

y = 1×10^7 pb , longueur moyenne du génome des actinomycètes (Hopwood *et al*, 1985).

Alors,

$$14\,700 = \ln (1 - P) / \ln (1 - 12\,500/1 \times 10^7)$$

$$14\,700 = \ln (1 - P) / \ln (0,99875)$$

$$P = 0,9998 = 99,9\%$$

ANNEXE 2

Séquences nucléotidiques des sous-clones de pMH31

```
1      CGCAAGCGCTCAATTAACCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGTGCGG
61     CCCGCCGCGAAGAACGCAGGTGACCCGGGATCTGCTGCCGGTGCTGGCCACGCGCGCGAT
121    AGCGTGACCGGCCGGCTGGAGCGGATGTTCCCGCAGACCACGACGTCCCGGCTGCGGGGC
181    GTCACGACCGGGGCGGGCTGGACCGAGGGCGCCCGAGCGGCGGACCGGGCCCAGGTCAGG
241    GCCGCCCCGCGCTGGAGTGACCCGCGCCTCAGTCGCCGAACTGCTGGAAGGCGCCCAAC
301    GAGGGCGTCGGGCTTTGTTCCCGCCCGGCCTTCCCGGCGAAACGGGGCGTACATTTTACA
361    GGAAGCTTGCGCGCTCTGTGTTTGGTGCCAGGCACAGGTGATCTTTACAGGTCTGTG
421    TCCGCCAGAGTGTTTTCCGCGCGCCGCTGTCGCGCCGCGCACATAGCTGACAGAGAAAA
481    GTCTCCGC
```

Fig. 21. Séquence nucléotidique du sous-clone pMH315 portant un insert d'ADN *Not* I-*Sal*I de 2,15 Kb provenant du fragment de 2,9 Kb de pMH31 et cloné dans pBluescript SKII.

1 GAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCCCCGGGTTCCTCCGGCGG
 61 GTGCCCCGGAGCAGGCAGGAGATGTCTTGGGGCCGAAACGCCCCCTCCTCCACAACAGACG
 121 CGAAACGCGCCCTTCTTGTTCCCTGATTCCGCGCGCCCCGGCCCCGAAACACGCGCGCATCC
 181 GGCGCACCGGGGATTCCCTCCGGGAGTCCTGCCGCGCGTCCGGAAATCGTCCGGGTAACT
 241 ACTGGTAACTTGCGCTGCGGGCCGTCCGGTGAGGACGGCCGGCCGCTACCGTCCGAGGAG
 301 CGTTCCGGTGACCTGTGCAACGGCGAGAGTGCGGAGCGCGGCCCTGGCCGCGGCAGTGGC
 361 GGGCGCGCTGGCGCTCACGGCGTGCGACGGCGGCACGTGCGGGGCACACCTCCGACGCCTC
 421 GCCGCGGCCCGGCCGCTCCGCGACCCCCGCCGACGGCCACCGTCTCCCCCGCCGCGACCGG
 481 CGCCGCCCTGGAGGGCAGCTGGATCACCACCGCCGGCGGCAGGGTCTTGGCCCTGGTGAT
 541 CACCGGGACACAGGCCGGACTCTTCTCGACCGACCGGACCGTGTGCAGTCTGGACGGCGG
 601 GGTCCGGATCCGGCGTGCGGACGATCCGCCTGACCTGCGCCCAGGGGGGCCGGGGGAGCG
 661 CACCACCGGCACGGTCGAGTCGGTGAACCGGCACGAACGCTACACGTAAGAACATAGTCA
 721 GGAGCAAGGCCGGGCCGGAGAGGACG

Fig. 22. Séquence nucléotidique du sous-clone pMH318D portant un insert d'ADN *SmaI-SmaI* de 1,6 Kb provenant de pMH31et cloné dans pBluescript SKII⁺.

1 TCGACTCCTTCGCCGACAGCTGGGGCTGGCACCCGCTCGCCGGCACCCCTCCAGGGCAAGG
61 TGGTCTGGGGCCCTGTTCCGGCTGCGCACGACCGGTGATCCGGTCCGGCGCGTGGCCGA
121 CTGATCGCTACGGCGCGCTGCCGGCGGACGCGTGGGCTTTCCCGCTTCTCCCGATTCCCTC
181 GGTCTCTGCGGCTGGCGGCTCTTCGCGCGGTCCGTGTCGACATTGGTTGCCAGGGACCGT
241 GTCCCGCGCGTGTGGCCGCGCGGTCAGCGTGCGAATCTAAGTGTGTCTCGACTCGCTCGT
301 GCCTTGATCCCCGCAGGAAGCCATCGCCGTCTCATCTTCTGCGCGCGTGTATACGAAGC
361 GCCGCGGCCGCTGCTGCGGAAGCGCGCAGTTGCGCCACGGCGGAACCTCACCGCGCCGGC
421 AGCCGCGCGAAACTCTACGCAGGACCCCTTCGA

Fig. 23. Séquence nucléotidique du sous-clone pMH319 portant un insert d'ADN *SmaI-SalI* de 0,8 Kb provenant de pMH31 et cloné dans pBluescript SKII⁺.

BIBLIOGRAPHIE

ALTSCHUL, S. F., W. GISH, W. MILLER, E. W. MYERS et D. J. LIPMAN. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.

ALTSCHUL, S. F., T. L. MADDEN, A. A. SCHAFFER, J. ZHANG, Z. ZHANG, W. MILLER et D. J. LIPMAN. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programmes. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.

BACON, J. S. D., V. C. FARMER, D. JONES et I. F. TAYLOR. 1969. The glucan components of the cell wall of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) considered in relation to its ultrastructure. *Biochem. J.* 114: 557-567.

BARTNICKI-GARCIA, S. 1968. Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* 22: 87-109.

BARTNICKI-GARCIA, S. et M. C. WANG. 1983. Biochemical aspects of morphogenesis in *Phytophthora*, p. 121-137. In D. C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia and P. H. Tsao (ed.). *Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology and pathology*. APS Press, St Paul, Minn.

BEGUIN, P. 1983. Détection of cellulase activity in polyacrylamide gels using congo red staining agar replicas. *Anal. Biochem.* 131: 333-336.

BIBB, M. J., P. R. FINDLAY et M. W. JOHNSON. 1984. The relationship between base composition and codon usage in bacterial genes and its use for the simple and reliable identification of protein-coding sequence. *Gene*. 30: 157-166.

BIELECKI, S. et E. GALAS. 1991. Microbial β -glucanases differnt from cellulases. *Crit. Rev. Biotechnol.* 10: 275-304.

BISHOP, C. T., F. BLANK et P. E. GARDNER. 1960. The cell wall polysaccharides of *Candida albicans*: glucan, mannan and chitin. *Can. J. Chem.* 38: 869-881.

BOHANNON, D. E. et A. L. SONENSHEIN. 1989. Positive regulation of glutamate biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 171 (9): 4718-4727.

BROADBENT, P., K. F. BAKER et Y. WATERWORTH. 1971. Bacteria and actinomycetes antagonistic to fungal root pathogens in Australian soils. *Aust. J. Biol. Sci.* 24: 925-944.

CHATTOPADHYAY, S. K. et B. NANDI. 1982. Inhibition of *Helminthosporium oryzae* and *Alternaria solani* by *Streptomyces longisporus* (Krasil'nikov) Waksman. *Plant Soil*. 69: 171-175.

COLE, S. T., R. BROSCHE, J. PARKHILL, T. GARNIER, C. CHURCHER, D. HARRIS, S. V. GORDON, K. EIGLMEIER, S. GAS, C. E. BARRY III, F. TEKAIA, K. BADCOCK, D. BASHAM, D. BROWN, T. CHILLINGWORTH, R. CONNOR, R. DAVIES, K. DEVLIN, T. FELTWELL, S. GENTLES, N. HAMLIN, S. HOLROYD, T. HORNSBY, K. JAGELS, A. KROGH, J. McLEAN, S. MOULE, L. MURPHY, S. OLIVER, J. OSBORNE, M. A. QUAIL, M. A. MAJEANDREAM, J. ROGERS, S. RUTTER, K. SEEGER, S. SKELTON, S. SQUARES, R. SQUARES, J. E. SULSTON, K. TAYLOR, S. WHITEHEAD et B. G. BARRELL. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393 (6685): 537-544.

CONTRERAS, A. et A. MAXWELL. 1992. *gyr B* mutations which confer coumarin resistance also affect DNA supercoiling and ATP hydrolysis by *Escherichia coli* DNA gyrase. *Mol. Microbiol.* 6: 1617-1624.

CRAWFORD, D. L., J. M. LYNCH, J. M. WHIPPS et M. A. OUSLEY. 1993. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3899-3905.

DEL CASTILLO, I. J. L., J. L. VIZAN, M. C. RODRIGUEZ-SAINZ et F. MORENO. 1991. An unusual mechanism for resistance to the antibiotic coumermycin A₁. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 8860-8864.

DEL REY, F., I. GARCIA-ACHA et C. NOMBELA. 1979. The regulation of β -glucanase synthesis in fungi and yeast. *J. Gen. Microbiol.* 110: 83-89.

DENIS, F. et R. BRZEZINSKI. 1992. A versatile shuttle cosmid vector for use in *Escherichia coli* and actinomycetes. *Gene.* 111: 115-118.

DITTY, J. L., A. C. GRIMM et C. S. HARWOOD. 1998. Identification of a chemotaxis gene region from *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol. Lett.* 159 (2): 267-273.

FAUCHER, E., T. SAVARD et C. BEAULIEU. 1992. Characterization of actinomycetes isolated from common scab lesions on potato tubers. *C. J. Plant Pathol.* 14: 197-202.

FAYAD, K. 1997. La β -1,6-glucanase de *Streptomyces* sp. EF-14, un actinomycète antagoniste à *Phytophthora* spp.: production, purification et caractérisation. Mémoire de Maîtrise. Département de Biologie. Faculté des Sciences. Université de Sherbrooke.

FLEET, G. H. et H. J. PHAFF. 1974. Lysis of yeast cell walls: glucanases from *Bacillus circulans* WL-12. *J. Bacteriol.* 119: 207-219.

FLEET, G. H. et D. J. MANNERS. 1977. The enzymic degradation of an alkali-soluble glucan from the cell walls in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Gen. Microbiol. 98: 315-327.

GHANGAS, G. S., Y-J. HU et WILSON, D. B. 1989. Cloning of a *Thermomonospora fusca* xylanase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Streptomyces lividans*. J. Bacteriol. 171 (6): 2963-2969.

GILBERT, M., R. MOROSOLI, F. SCHARECK et D. KLUEPFEL. 1995. Production and secretion of protein by Streptomycetes. Crit. Rev. Biotechnol. 15: 13-39.

GISH, W. et D. J. STATES. 1993. Identification of protein coding regions by database similarity search. Nat. Genet. 3: 266-272.

GOPAL, P., P. A. SULLIVAN et M. G. SHEPHERD. 1984. Isolation and structure of glucan from regenerating spheroplasts of *Candida albicans*. J. Gen. Microbiol. 130: 1217-1225.

HIURA, N., NAKAJIMA T. et MATSUDA K. 1987. Purification and some properties of an endo- β -1,6-glucanase from *Neurospora crassa*. Agric. Biol. Chem. 51: 3315-3321.

HOPWOOD, D. A., M. J. BIBB, K. F. CHATER, T. KIESER, C. J. BRUTON, H. M. KIESER, D. J. LYDIATE, C. P. SMITH, J. M. WARD ET H. SCHREMPF. 1985. Genetic manipulation of *Streptomyces*, a laboratory manual. The John Innes Foundation. Norwich. 338 p.

INOVE, J., J. P. SHAW, M. REKIK et S. HARAYAMA. 1995. Overlapping substrate specificities of benzaldehyde dehydrogenase (the *xylC* gene product) and 2-hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase (the *xylG* gene product) encoded by TOL plasmid pWWO of *Pseudomonas putida*. J. Bacteriol. 177 (5): 1196-1201.

JONES, G. H. et D. A. HOPWOOD. 1984. Molecular cloning and expression of the phenoxazinone synthase gene from *Streptomyces antibioticus*. J. Biol. Chem. 259 (22): 14151-14157.

KATOHDA, S., F. SUZUKI, S. KATSUKI et T. SATO. 1979. Purification and some properties of endo- β -1,6-glucanase from *Acinetobacter* sp. Agric. Biol. Chem. 43: 2029-2034.

KNAUSS, J. S. 1976. *In vitro* antagonistic activity of several *Streptomyces* spp. against species of *Pythium* and *Phytophthora*. Plant Dis. Rep. 60: 846-850.

KOFOD, L. V., L. N. ANDERSEN, M. S. KAUPPINEN, N. S. CHRISTGAU, H. DALBOGE et H. S. OLSEN. 1998. Enzyme with β -1,6-endoglucanase activity. United States Patent. Patent Number 5770406.

LAHDENPERA, M. L., E. SIMON et J. UOTI. 1991. Mycostop-a novel biofungicide based on *Streptomyces* bacteria, p. 258-263. In A. B. R. Beemster, G. J. Bollen, M. Gerlach, M. A. Ruissen, B. Schippers and R. A. Tempel (ed.). Biotic interactions and soil-borne diseases; proceedings of the 1st Conference of the European Foundation for Plant Pathology. Elsevier, Amsterdam.

LATHE, R. 1985. Synthetic oligonucleotide probes deduced from amino acid sequence data. Theoretical and practical considerations. J. Mol. Biol. 183: 1-12.

LEVER, M. 1973. Colorimetric and fluorimetric carbohydrate determination with p-hydroxybenzoic acid hydrazide. Biochem. Med. 7:274-281.

LINDBERG, B. et J. McPHERSON. 1954. Studies on the chemistry of lichens. VI. The structure of pustulan. Acta Chem. Scand. 8: 985-988.

LORA, J. M., J. DE LA CRUZ, A. LLOBELL, T. BENITEZ et J. A. PINTER-TORO. 1995. Molecular characterization and heterologous expression of an endo- β -1,6-glucanase from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. Mol. Gen. Genet. 247: 639-645.

MANNERS, D. J., A. J. MASSON et J. C. PATTERSON. 1973. The structure of a β -1,3-D-glucan from yeast cell walls. Biochem. J. 135: 31-36.

MANOIL, C. et J. BECKWITH. 1986. A genetic approach to analysing membrane protein topology. Science. 233: 1403-1408.

MATTHYSSE, A. G., S. WHITE et R. LIGTHFOOT. 1995. Genes required for cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol. 177 (4): 1069-1075.

MAXWELL, A. 1993. The interaction between coumarin drugs and DNA gyrase. Mol. Microbiol. 9: 681-686.

MIYAZAKI, T. et N. OIKAWA. 1976. An endo-(1,6)- β -D-glucanase from *Mucor hiemalis*. Carbohydr. Res. 48: 209-216.

MOTAMEDI, H. et R. HUTCHINSON. 1987. Cloning and heterologous expression of a gene cluster for the biosynthesis of tetracenomycin C, the anthracyclin antitumor antibiotic of *Streptomyces glaucescens*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84: 4445-4449.

NAVARRO, F., S. CHAVEZ, P. CANDAU et F. J. FLORENCIO. 1995. Existence of two ferredoxin-glutamate synthases in the Cyanobacterium *Cynechocystis* sp. PCC6803. Isolation and insertional inactivation of *glt B* and *glt S* genes. Plant Mol. Biol. 27 (4): 753-767.

NORONHA, E. F. et C. J. ULHOA. 1996. Purification and characterization of an endo- β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. Can. J. Microbiol. 42: 1039-1044.

OLD, I. G., G. A. TRUEBA, I. SAINT GIRONS et R. C. JOHNSON. 1997. A *cheA cheW* operon in *Borrelia burgdorferi*, the agent of lyme disease. Res. Microbiol. 148: 191-200.

ORKIN, S. H., P. E. DADONNA, D. S. SHEWACH, A. F. MARKHAM, G. A. BRUNS, S. C. GOFF et N. W. KELLEY. 1983. Molecular cloning of human adenosine deaminase gene sequences. J. Biol. Chem. 258: 12753-12756.

PAPAVIZAS, G. C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. Annu. Rev. Phytopathol. 23: 23-24.

PITSON, S. M., R. J. SEVIOUR et B. M. MCDOUGALL. 1993. Noncellulolytic fungal β -glucanases: their physiology and regulation. Enzyme Microb. Technol. 15: 178-192.

PITSON, S. M., R. J. SEVIOUR, B. M. MCDOUGALL, B. A. STONE et M. SADEK. 1996. Purification and characterization of an extracellular (1,6)- β -glucanase from the filamentous fungus *Acremonium persicinum*. Biochem. J. 316: 841-846.

REDENBACH, M., H. M. KIESER, D. DENAPATE, A. EICHNER, J. CULLUM, H. KINASHI et D. A. HOPWOOD. 1996. A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. Mol. Microbiol. 21 (1): 77-96.

REESE, E. T., F. W. PARRISH et M. MANDELS. 1962. β -D-1,6-glucanases in fungi. Can. J. Microbiol. 8: 327-334.

ROMBOUTS, F. M. et H. J. PHAFF. 1976. Lysis of yeast cell walls. Lytic β -(1,6)-glucanase from *Bacillus circulans* WL-12. Eur. J. Biochem. 63: 109-120.

ROMBOUTS, F. M., G. H. FLEET, D. J. MANNERS et H. J. PHAFF. 1978. Lysis of yeast cell-walls: non-lytic and lytic (1,6)- β -D-glucanases from *Bacillus circulans* WL-12. Carbohydr. res. 64: 237-249.

ROTHROCK, C. S. et D. GOTTLIEB. 1984. Role of antibiosis in antagonism of *Streptomyces hygroscopicus* var *geldanus* to *Rhizoctonia solani* in soil. Can. J. Microbiol. 30: 1440-1447.

SABAOU, N. et N. BOUNAGA. 1987. Actinomycètes parasites de champignons: études des espèces, spécificité de l'action parasitaire au genre *Fusarium* et antagonisme dans le sol envers le *Fusarium oxysporium* F. sp. *albedinis* (Killian et Marie) Gordon. Can. J. Microbiol. 33: 445-

451.

SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH et T. MANIATIS. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. 2^e édition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New-York.

SAMUELS, D. S., R. T. MARCONI, W. M. HUANG et C. F. GARON. 1994. *gyr B* Mutations in coumermycin A₁-resistant *Borrelia burgdorferi*. J. Bacteriol. 176 (10): 3072-3075.

SANO, K., A. AMEMURA et T. HARADA. 1975. Purification and properties of a β -1,6-glucosidase from *Flavobacterium*. Biochim. Biophys. Acta. 377: 410-420.

SANTOS, T., J. R. VILLANUEVA et C. NOMBELA. 1977. Production and catabolite repression of *Penicillium italicum* β -glucanases. J. Bacteriol. 129: 52-58.

SCHEP, G. P., M. G. SCHEPHERD et P. A. SULLIVAN. 1984. Purification and properties of a β -1,6-glucanase from *Penicillium brefeldianum*. Biochem. J. 223: 707-714.

SHIBATA, Y. et T. FUKIMBARA. 1973. Enzymic hydrolysis of glucans containing β -1,3 and β -1,6-linkages: β -1,6-glucan hydrolase of fungi. J. Ferment. Technol. 51: 216-226.

SPIRO, R. G. 1966. Analysis of sugars found in glycoproteins. Meth. Enzymol. 8: 3-26.

STAHL, E. et U. KALTENBACH. 1961. Dünnschicht-chromatographie. J. Chromatogr. 5: 351-355.

TIWARI, R. P., W. G. REEVE, M. J. DILWORTH et A. R. GLENN. 1996. Acid tolerance in *Rhizobium meliloti* strain WSM419 involves a two-component sensor-regulator system. Microbiol. 142(Pt 7): 1693-1704.

TOUSSAINT, V., D. VALOIS, M. DODIER, E. FAUCHER, C. DERY, R. BRZEZINSKI, L. RUEST et C. BEAULIEU. 1997. Characterization of actinomycetes antagonistic to *Phytophthora fragariae* var *rubi*, the causal agent of raspberry root rot. Phytoprotection. 78 (2): 43-51.

VALOIS, D., K. FAYAD, T. BARASUBIYE, M. GARON, C. DERY, R. BRZEZINSKI et C. BEAULIEU. 1996. Glucanolytic actinomycetes antagonistic to *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, the causal agent of raspberry root rot. Appl. Environ. Microbiol. 62: 1630-1635.

VARNER, J. E. et L. S. LIN, 1989. Plant cell wall architecture. Cell. 56: 231-239.

VON HEIJNE, G. 1988. Transcending the impenetrable: how proteins come to terms with

membranes. Biochim. et Biophys. Acta, 947: 307-333.

WHITEHEAD, A. S., G. A. P. BRUNS, A. F. MARKHAM, H. R. COLTEN et D. E. WOODS. 1983. Isolation of human C-reactive protein complementary DNA and localisation of the gene to chromosome 1. Science. 221: 69-71.

WILLIAMS, S. T., M. GOODFELLOW, G. ALDERSON, E. M. H. WELLINGTON, P. H. A. SNEATH et M. J. SACKIN. 1983. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. J. Gen. Microbiol. 129: 1743-1813.

YALPANI, M. 1988. Polysaccharides, synthesis, modification and structure/property relations. Elsevier, Amsterdam.

YAMAMOTO, S., R. KOBAYASHI et S. NAGASAKI. 1974. Purification and properties of an endo β -1,6-glucanase from *Rhizopus chinensis* R-69. Agric. Biol. Chem. 38: 1493-1500.

YAMAMOTO, H., S. UCHIYAMA, F. A. NUGROHO et J. SEKIGUCHI. 1997. A 23,4 Kb segment at the 69 degrees -70 degrees region of the *B. subtilis* genome. Microbiol. 143 (Pt 4): 1317-1320.

YAMASHITA, I., M. NAKAMURA et S. FUIKI. 1987. Gene fusion is a possible mechanism underlying the evolution of STA1. J. Bacteriol. 169 (5): 2142-2149.

YAPHE, W. et DUCKWORTH, M. 1972. The relationship between structures and biological properties of agars. In Proceedings of the 7th International Seaweed Symposium, pp. 15-22. Edited by K. Nisizawa. New York: Halstead Press.

ZEVENHUIZEN, L. P. T. M. et S. BARTNICKI-GARCIA. 1969. Chemical structure of the insoluble hyphal wall glucan of *Phytophthora cinnamomi*. Biochemistry. 8: 1496-1502.